

**UNTERSUCHUNGEN AN
KEIMUNGSCHEMMENDEN EXTRAKTEN
AUS SPELZEN VON AVENA SATIVA L.**

Rudolf Karl

1970

UNTERSUCHUNGEN AN KEIMUNGSHEMMENDE

EXTRAKTEN AUS SPELZEN VON

AVENA SATIVA L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereiches Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Rudolf KARL

aus

Gilching

1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 29.9.1978

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Rüdiger danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, für seine hilfreiche Unterstützung und für seine stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschläge, die er der Arbeit zuteil werden ließ.

Mein Dank gilt auch Fr. Blos für die gaschromatographischen Untersuchungen der Ätherfraktion pH 1,0 des Haferspelzenextraktes.

Für die hochdruckflüssigchromatographische Trennung von Keimungshemmstoffe enthaltenden Fraktionen bedanke ich mich bei Frl. Wieschhoff.

Für die Überlassung größerer Mengen an Spelzen von *Avena sativa* L. danke ich der Fa. Maizena, Heilbronn und der Mayer- Mühle, Landshut.

Ferner danke ich Herrn Dr. Fuchs von der Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur u. Pflanzenbau für die Überlassung von Proben von *Avena fatua* L.

Inhaltsverzeichnis
=====

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Ursachen der Keimruhe	1
1.2. Die Keimruhe der Gramineen unter besonderer Berücksichtigung von <i>Avena sativa</i> L. und <i>Avena fatua</i> L.	4
1.3. Problemstellung	6
2. Ergebnisse	7
2.1. Nachweis von keimungs- bzw. entwicklungshemmenden Substanzen in Spelzen von <i>Avena sativa</i> L. und deren universelle Wirksamkeit	7
2.1.1. Nachweis von keimungshemmenden Substanzen	7
2.1.2. Universelle Wirksamkeit des Hemmstoffes	8
2.2. Ausarbeitung eines geeigneten Biotestes	12
2.3. Optimierung der Extraktionsbedingungen	14
2.3.1. Extraktion bei 27°C	14
2.3.2. Vergleich der Hemmwirkung der bei 4°C und durch Hitzeextraktion gewonnenen Extrakte	15
2.4. Grobbestimmung des Molekulargewichtes mittels Dialyse	16
2.5. Reinigung und Anreicherung der Hemmstoffe	16
2.5.1. Auftrennung des Haferspelzenextraktes mittels Gelfiltration an Acrylex- P 2	17
2.5.2. Auftrennung der Fraktion II der Gelfiltration durch Ausschütteln mit Äther bei verschiedenen pH- Werten	19
2.5.3. Ermittlung der quantitativen Verteilung der Hemmwirkung auf die bei den Auftrennungsschritten erhaltenen Fraktionen durch Berechnung von Hemmeinheiten	21
2.5.4. Orientierende Versuche zur hochdruckflüssigchromatographischen Trennung von Keimungshemmstoffen enthaltenden Fraktionen	28

	Seite
2.5.4.1. Gelchromatographische Trennung mit CPG 10 (Controlled Pore Glass) sowie gel- und adsorptionschromatographische Trennung an Lichrosorb SI 100	28
2.5.4.2. Trennung der Ätherphase pH 1,0 mittels HPLC- Technik an Reverse- Phase- Gel	30
2.5.5. Auftrennung der Ätherphase pH 7,0	32
2.5.5.1. Auftrennung auf Celluloseplatten	32
2.5.5.2. Auftrennung auf Kieselgelplatten	34
2.5.5.3. Auftrennung der Ätherphase pH 7,0 mittels Hochspannungselektrophorese	35
2.5.5.4. Auftrennung der neutralen Substanzen der Ätherphase pH 7,0	37
2.6. Untersuchungen zur Identifizierung der Hemmsubstanzen des Haferspelzenextraktes	39
2.6.1. Identifizierung der Hemmsubstanzen der Ätherphase pH 1,0 und ihre Prüfung auf keimungshemmende Wirksamkeit	41
2.6.1.1. Dünnschichtchromatographie der Ätherphase pH 1,0	42
2.6.1.2. Prüfung von Phenolcarbonsäuren und Abscisinsäure auf ihre keimungshemmende Wirksamkeit	44
2.6.2. Quantitative Bestimmung der in der Ätherphase pH 1,0 enthaltenen Phenolcarbonsäuren mittels Gaschromatographie	46
2.7. Prüfung des Haferspelzenextraktes auf keimungshemmende Substanzen, die nicht mit Äther ausschüttelbar sind	52
2.8. Antagonismus von keimungshemmenden Substanzen aus Haferspelzen und β - Indolyl- 3- essigsäure	54
2.9. Diskussion der Ergebnisse	57
3. Material und Methoden	66
3.1. Geräte	66
3.2. Dünnschichtchromatographie	68
3.2.1. Kieselgelplatten	68

	Seite
3.2.2. Cellulose- Dünnschichtplatten	69
3.3. Gewinnung von peroxidfreiem Äther	69
3.4. Darstellung von Diazomethan aus N- Methyl- N-nitroso- p- toluolsulfonamid	70
3.5. Pflanzenmaterial	70
3.6. Biotest	72
3.7. Extraktionsmethoden	72
3.7.1. Extraktion der Haferspelzen bei 27°C	72
3.7.2. Extraktion der Haferspelzen bei 4°C	73
3.7.3. Hitzeextraktion der Haferspelzen	73
3.8. Auftrennung des Haferspelzenextraktes mittels Gelfiltration an Acrylex- P 2- Gel und Bio- Gel- P 2	74
3.9. Auftrennung der bei der Gelfiltration des Hafer- spelzenextraktes an Acrylex- P 2 erhaltenen Frak- tion II durch Ausschütteln mit Äther bei ver- schiedenen pH- Werten	75
3.10. Auftrennung der Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0 und der nach Ausschütteln der Fraktion II der Gel- filtration mit Äther verbleibenden wässrigen Phase durch Hochdruckflüssigchromatographie	76
3.10.1. Trennung auf CPG 10 bzw. Lichrosorb SI 100	76
3.10.2. Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 an Reverse- Phase- Gel	77
3.11. Auftrennung der Ätherphase pH 7,0 mittels Hoch- spannungselektrophorese	78
3.12. Entfernung geladener Substanzen aus der Äther- phase pH 7,0 durch Mischbett- Ionenaustauscher- chromatographie	78
3.13. Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammen- setzung des Haferspelzenextraktes	79
3.14. Quantitative Bestimmung der in der Ätherphase pH 1,0 enthaltenen Phenolcarbonsäuren mittels Gaschromatographie	80

	Seite
4. Zusammenfassung der Ergebnisse	82
5. Literaturverzeichnis	85
6. Tabellenanhang	89

1. Einleitung und Problemstellung

Die Ontogenie einer Pflanze ist kein gleichmäßiger Prozess, sondern es sind Perioden dazwischengeschaltet, in denen die Entwicklung mehr oder weniger verzögert ist. Bei zahlreichen Pflanzen sind die Samen unmittelbar nach dem Freiwerden von der Mutterpflanze keimfähig. In vielen Fällen dagegen befinden sich diese in einem Zustand, in dem sie nicht in der Lage sind, unter natürlichen Bedingungen sofort auszukeimen, d.h. sie durchlaufen eine Keimruhe (englisch: „dormancy“), wobei erst nach deren Ende die volle Keimpotenz erreicht wird.

1.1. Ursachen der Keimruhe

Die Keimruhe der Samen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst.

a.) Wachstum des Embryo

Samen der Esche (*Fraxinus excelsior* L.) sind nach dem Freiwerden von der Mutterpflanze nicht sofort keimfähig. Erst nach mehrmonatiger Lagerung in feuchtem Substrat wird die volle Keimfähigkeit erreicht. Während dieser Zeit findet ein Wachstum des morphologisch vollständig entwickelten Embryos innerhalb des Samens statt (VILLIERS und WAREING, 1964).

Bei *Heracleum sphondylium* sind die Embryonen zum Zeitpunkt des Fruchtfalls nur rudimentär ausgebildet und bestehen meist nur aus einer geringen Gewebemasse (STOKES, 1952). Die Nachreifung der Samen ist verbunden mit dem Wachstum der nicht vollständig entwickelten Embryonen. Ähnliche Verhältnisse liegen bei *Ilex opaca* (IVES, 1923) und *Panax ginseng* (STOKES, 1965) vor.

Die meisten Saaten, die kalte Stratifikation, trockene Lagerung oder eine Lagerung in feuchtem Boden brauchen, um nachzureifen, haben vollständig entwickelte Embryonen, und die Änderungen, die während der Keimruhe ablaufen, sind chemischer bzw. physiologischer Natur (POLLOCK und TOOLE, 1961; STOKES, 1952).

b.) Nachreife durch Trocknung

Samen mancher Pflanzen erreichen ihre volle Keimfähigkeit erst dann, wenn diese einen Trocknungsprozess durchlaufen haben. Die volle Keimpotenz wird bei Maissamen erst nach trockener Lagerung erreicht, wobei die Zunahme der Keimfähigkeit einer Abnahme des Wassergehaltes entspricht (HESS, 1970).

c.) Impermeabilität für Gase und Wasser

Für die während der Keimung ablaufenden Prozesse der Zellteilung und der Zellstreckung ist Energie in beträchtlicher Menge, ebenso wie eine ausreichende Wasserversorgung unabdingbar. Die zur Nutzbarmachung der gespeicherten Reserveenergien ablaufenden Prozesse der Substrat- und Atmungskettenphosphorylierung setzen im allgemeinen eine entsprechende Versorgung mit Sauerstoff voraus. Nun können aber die den Embryo umgebenden Schichten mehr oder weniger gas- bzw. wasserundurchlässig sein, so daß eine Keimung nicht erfolgen kann.

BARNETT (1976) zeigte den Einfluß von Samenschale und Megagametophyt auf die niedrige Keimrate von *Pinus ssp.* Nach Entfernen der Samenschale stellte er höhere Raten an Wasser- und Sauerstoffaufnahme fest, ferner nahm die Größe des Megagametophyten während der Keimung zu und die Keimung erfolgte rascher. Ebenso stellte GARDENER (1975) fest, daß bei Samen von *Styolantes* nicht Keimungshemmstoffe, sondern der durch die Hülse und Samenschale behinderte Eintritt von Wasser in die Samen die Ursache für die Keimruhe darstellen. SIDHU und CAVERS (1976) beobachteten, daß Samen von *Medicago lupulina L.*, die unter weniger optimalen Bedingungen reifen, eine impermeable Testa ausbilden und strenge Keimruhe zeigen, die über mehrere Jahre andauern kann. Morphologische und anatomische Studien weisen darauf hin, daß der Embryo-reife die Entstehung einer Impermeabilität in der Testa vorausgeht. Möglicherweise führt diese Impermeabilität der Samenschale zu einer Abnahme der Sauerstoffspannung in der Umgebung des Embryos bis zu einem Spiegel, der entweder für die Versorgung der Atmung, für die eine bestimmte Rate während der Keimung erforderlich ist, zu gering ist, oder aber sie führt zur Synthese oder

verstärkt die Wirkung eines Hemmstoffes (MOTT, 1974).

d.) Inhibitoren

Alle Pflanzenteile einschließlich Blätter, Stengel, Knospen, Blütenteile, Früchte, Samen und Wurzeln können Keimungshemmstoffe enthalten oder ausscheiden. Die Hemmstoffe sind im ganzen Pflanzenreich verbreitet und nicht auf eine Pflanzenfamilie beschränkt. Bereits im Jahre 1949 führte EVENARY 101 Pflanzenspezies auf, bei denen Keimungshemmstoffe nachgewiesen wurden. Zahlreiche dieser Hemmsubstanzen konnten inzwischen angereichert bzw. isoliert und zum Teil auch ihre chemische Struktur und ihre biochemische Wirkungsweise aufgeklärt werden.

In den meisten Fällen sind diese natürlichen Keimungshemmstoffe relativ einfache organische Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht. Die einfachsten, wie z.B. Blausäure, Ammoniak und Äthylen sind flüchtig. Einige der Senföle und essentiellen Öle, die besonders wirksam sind, sind ebenfalls flüchtig. Aldehyde, Phenole, Alkaloide, Zimtsäuren und organische Säuren (abscistische) sind Beispiele für natürlich vorkommende Substanzen, welche die Keimung hemmen (Zusammenfassung: KETRING, 1973). Daneben kennt man heute eine ganze Reihe synthetischer Hemmsubstanzen, die in der gärtnerischen und landwirtschaftlichen Praxis eine wichtige Rolle spielen. Aber auch Schwermetalle können einen Einfluß auf die Keimung bzw. das Wachstum des Keimlings ausüben (LEPP, 1976; YOSHIMURA und MURAYAMA, 1976). Freie Aminosäuren wurden von verschiedenen Autoren als mögliche Keimungshemmstoffe angesehen (vergl. Seite 52). Aber auch Gerbstoffe können am Zustandekommen der Keimungshemmung beteiligt sein (siehe Seite 54).

Keimungshemmstoffe sind meist nicht artspezifisch, so daß ein Hemmstoff die Keimung mehrerer Arten beeinträchtigen kann. Die Empfindlichkeit verschiedener Samen gegenüber der gleichen Konzentration eines Hemmstoffes variiert dagegen sehr. Die physiologischen Wirkungen der Hemmstoffe sind osmotische Einflüsse und pH - Änderungen, Hemmung der Atmung, Änderung der Membrandurchlässigkeit, Hemmung des Auxintransportes, Bindung der Enzym-SH-Gruppen und Hemmung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese (Zusammenfassung: KETRING, 1973).

1.2. Die Keimruhe der Gramineen unter besonderer Berücksichtigung von Avena sativa L. und Avena fatua L.

Nach KOLLER (1955) ist die Keimruhe nur ein theoretischer Begriff, denn der Unterschied zwischen keimenden und nicht keimenden Samen liege nur an den Bedingungen, die der Embryo zur Keimung verlangt. Nach OWEN (1956) ist die Keimruhe der Gramineen in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen während der Reife der Samen in jedem Jahr verschieden stark ausgeprägt. Das kann auf Grund der auftretenden Temperaturen, der Strahlungintensität und der Wasserversorgung zu einer Prognose über die zu erwartende Keimruhe führen.

Die Gramineen gehören zu den Lichtkeimern, doch ist ihre Fähigkeit, nur im Licht zu keimen, im Laufe des Alters der Samen sehr unterschiedlich. NIETHAMMER wies bereits 1931 nach, daß bei den meisten in der Literatur aufgeführten Lichtkeimern die Bedeutung des Lichtes für die Keimung mit fortschreitendem Samenalter und zunehmender Reife abnimmt.

MAYER und POLJAKOFF - MAYBER (1963) nahmen an, daß die photochemische Reaktion, die, wie man inzwischen weiß, über das reversible Phytochromsystem gesteuert wird, bei der Keimung eng mit anderen chemischen Reaktionen verbunden ist. VEGIS (1964) schloß aus den Arbeiten anderer Autoren, daß die zur Keimung erforderliche Lichtmenge ein Minimum bei der optimalen Keimungstemperatur hat.

Ferner ist bekannt, daß kühlere Jahre bei allen Gramineen eine stärkere Keimruhe hervorrufen. Dies konnten u.a. STAJKOW (1959), LUDWIG und JUNGES (1963) bei Braugerste und BELDEROK (1961) bei Weizen zeigen.

Neben Licht und Temperatur wirkt vor allem die Wasserversorgung auf die Entstehung und Stärke der Keimruhe. Da feuchte Jahre im allgemeinen geringere Strahlung und niedrigere Temperaturen aufweisen, führt dies zu einer starken Ausbildung der Keimruhe. Samen des Flughafers, ein weit verbreitetes und äußerst schwierig zu bekämpfendes Ackerunkraut, können mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte im Boden bleiben, ohne auszukeimen. Nach ATWOOD

(1914) stellt der Sauerstoff den limitierenden Faktor bei der Keimung von frisch geernteten Samen von *Avena fatua* dar und er nahm an, daß entweder der Bedarf des Embryos an Sauerstoff während der Nachreifung abnimmt, oder aber daß nicht die Abnahme des Sauerstoffbedarfes, sondern eine Zunahme der Permeabilität der Samenschale für die bessere Keimfähigkeit nach der Keimruhe verantwortlich ist.

Keinen Vorteil in der Keimfähigkeit entspelzter Samen gegenüber unentspelzten fand EDLER (1908) bei 1/2 Jahr alten Samen von *Avena sativa*. Keimungsförderung durch Entspelzen stellte dagegen KIESSLING (1911) fest. ZADE (1909) berichtete von *Avena fatua*, daß sich bespelzte Karyopsen in der Keimung entspelzten gegenüber stets stark gehemmt zeigen und erörterte die Möglichkeit der Abscheidung eines keimungshemmenden Stoffes durch die Spelzen. MOTT und TYNAN (1974) konnten an *Aristida contorta*, einem Gras der ariden Zone, durch Elektronenmikroskopie zeigen, daß eine geschlossene lipidhaltige Schicht die innere Oberfläche der Epidermis der Samenschale bei ruhenden Samen bedeckt, und daß diese eine löchrige Struktur bei nicht ruhenden Samen aufweist, so daß durch die anatomischen Veränderungen eine erhöhte Sauerstoffversorgung des Embryos gewährleistet ist.

BLACK (1959) konnte sowohl in wässrigen Extrakten aus Spelzen als auch aus Karyopsen von *Avena fatua* nach Chromatographie zwei Hemmbereiche finden. Nach seinen Untersuchungen kann der Hemmeffekt der Spelzen bei intakten ruhenden Samen weder den in den Spelzen vorhandenen Inhibitoren allein zugeschrieben werden, noch reicht eine Beeinträchtigung des Gasaustausches durch dieses Gewebe aus, diesen Effekt zu erklären. Vielmehr sollen die Spelzen ein Auslaugen von Inhibitoren aus den Karyopsen verhindern. Ferner kann er nach Induktion einer sekundären Keimruhe unter anaeroben Bedingungen eine deutliche Zunahme der Inhibitormenge in den Karyopsen nachweisen.

Wasserlösliche Inhibitoren aus *Avena fatua* konnten außerdem von KOMMEDAHL (1958); HAY (1962) und SHARMA, MCBEATH und VANDEN BORN (1976) nachgewiesen werden.

ELLIOTT und LEOPOLD (1952) konnten auch in Samen von *Avena sativa* einen wasserlöslichen Keimungshemmstoff nachweisen, wobei

sie den Hauptanteil dieser Substanz in den Spelzen fanden. Dieser Hemmstoff ist in der Lage, sowohl die Aktivität von α - und β - Amylase, als auch das Wachstum etiolierter Erbsensegmente zu hemmen. Nach diesen Untersuchungen handelt es sich um eine nicht dialysierbare, hitzestabile Substanz, angeblich ein Polypeptid. Verschiedene Phenolcarbonsäuren wurden ebenfalls als Keimungshemmstoffe bei Getreide diskutiert (vergl. S. 39).

WINTER und SIEVERS (1952) haben nachgewiesen, daß Kaltwasserauszüge aus Gramineenblattstreu Keimung und Entwicklung einer Reihe von Nutzpflanzen artspezifisch beeinflussen. Zu entsprechenden Aussagen kamen WINTER und SCHÖNBECK (1953) und konnten dabei zeigen, daß Extrakte von Hafer-, Roggen-, Weizen- und Gerstenstroh vor allem auf die Entwicklung der Getreidekeimlinge hemmend wirken, während die Keimung weniger deutlich beeinflußt wurde. Die Stroharten unterschieden sich in ihrer Wirksamkeit, wobei die Empfindlichkeit der Sämlinge gegenüber den einzelnen Extrakten artspezifische Eigentümlichkeiten aufwies. Die am stärksten ausgeprägte Hemmung verursachte allgemein der Haferstrohauszug, die schwächste das Roggenstroh. Die Ergebnisse der Autoren weisen gewisse Übereinstimmungen mit alten Fruchtfolge-regeln auf, in denen der Roggen unter den Halmfrüchten für Getreide als beste Vorfrucht gilt, Hafer dagegen oft als „abtragende“ Frucht empfohlen wird. Ferner stellten sie fest, daß die hemmende Wirkung von Weizenstrohextrakt durch 2 1/2 - stündiges Erhitzen bei 95°C nicht vermindert wird.

1.3. Problemstellung

Da die von ELLIOTT und LEOPOLD in den Spelzen von *Avena sativa* nachgewiesene keimungshemmende Substanz noch nicht näher charakterisiert wurde, sollte zunächst ein brauchbares Extraktionsverfahren ausgearbeitet werden. Mittels verschiedener Trennmethode soll die Hemmsubstanz angereichert werden, wobei es erforderlich ist, eine mögliche Verteilung unterschiedlicher Hemmsubstanzen (zwei keimungshemmende Bereiche bei *Avena fatua*) auf verschiedene Trennungsschritte mittels eines aussagekräftigen Biotestes quantitativ zu erfassen.

Daneben soll auch geklärt werden, welchen Einfluß die von verschiedenen Autoren aus Getreidestroh isolierten Phenolcarbonsäuren und die in Samen enthaltenen Aminosäuren und die in zahlreichen Samenschalen vorkommenden Gerbstoffe auf die Keimung ausüben.

2. Ergebnisse

=====

2.1. Nachweis von keimungs- bzw. entwicklungshemmenden Substanzen in Spelzen von Avena sativa L. und deren universelle Wirksamkeit.

2.1.1. Nachweis von keimungshemmenden Substanzen

In eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, daß die entspelzten Samen von Avena sativa (Sorte „Husar“) kurze Zeit nach der Ernte im Vergleich zu nicht entspelzten Samen deutlich schneller keimten. Dieser Vorteil konnte aber nach einer Lagerzeit von ca. zwei Jahren nicht mehr festgestellt werden, vielmehr erfolgte dann eine nahezu gleich schnelle Keimung.

Die Hemmung der Keimung bespelzter Karyopsen könnte auf Erschwerung des Sauerstoffzutrittes beruhen. Daß aber mangelnde Sauerstoffversorgung des Embryos nicht die einzige Ursache der Keimungshemmung sein kann, zeigen Keimversuche, bei denen entspelzte Samen von Avena sativa in einem durch Hitzeextraktion (siehe Seite 73) gewonnenen Spelzenextrakt gekeimt wurden. In beiden Fällen ist in Abhängigkeit von der Konzentration des Extraktes eine deutliche Verminderung des Wachstums der aus dem Embryo hervorgegangenen Pflanzenorgane gegenüber dem Wachstum der Wurzeln und Koleoptilen der Wasserkontrolle zu ersehen (siehe Abb. 1, Seite 10), obwohl hier der Sauerstoff genauso Zutritt hat, wie zu den Kontrollen. Bei den Keimversuchen wurden die mit zwei Lagen Filtrierpapier versehenen Petrischalen

mit einer definierten Menge an Testlösung bzw. dest. Wasser bei den Kontrollversuchen beschickt (vergl. Keimungsbedingungen, Seite 72). Eine Konzentrierung der Testlösungen durch Verdunstung während der 48- stündigen Keimzeit konnte ausgeschlossen werden, da alle Petrischalen mit Deckel versehen waren und außerdem im Brutschrank eine relative Luftfeuchtigkeit von über 90 % herrschte.

Die Wirkung hemmstoffhaltiger Lösungen zeigte sich nicht in einer Reduzierung der Keimprozente, die von sehr vielen Autoren als Maß für die Effektivität von Inhibitoren herangezogen wird, sondern es wurden bei allen Versuchen gleich hohe Keimprozente beobachtet (außer bei Konzentrationen, bei denen die Keimung nahezu völlig unterdrückt wurde). Dieses Verhalten sollte aber auch eigentlich erwartet werden, wenn es sich bei dem Testsaatgut um ein einheitliches und qualitativ gleichwertiges Saatgut handelt, denn ansonsten ist anzunehmen, daß hemmstoffhaltige Lösungen in einer Testschale auf die einzelnen Samenkörner eine unterschiedlich starke Hemmwirkung ausüben, d.h. daß es sich dabei um ein nicht homologes Testmaterial handelt.

2.1.2. Universelle Wirksamkeit des Hemmstoffes

Bisner ist unbekannt, ob im Spelzenextrakt von *Avena sativa* eine oder mehrere Hemmsubstanzen vorliegen. Falls es sich bei den keimungs- bzw. wachstumshemmenden Substanzen aus Haferspelzen um universelle Wirkstoffe handelt, sollten sie ihre Wirkung nicht nur auf die Ontogenese des jeweiligen Individuums entfalten, sondern auch ihren Einfluß auf biochemische Prozesse während der Keimung von Pflanzen anderer Gattungen ausüben. Wie die Abbildungen (1 und 2) zeigen, lassen sich durch einen wäßrigen Extrakt aus Haferspelzen (Hitzeextraktion) nicht nur entspelzte Karyopsen von Hafer, sondern auch von anderen monokotylen Pflanzen wie etwa Hirse (*Sorghum spec.*, Sorte Silberhirse, entspelzt) oder aber auch von dikotylen Pflanzen wie Fuchschwanz (*Amaranthus caudatus*) und Rettich (*Raphanus spec.*, Sorte „Münchner Bier“) in ihrer Entwicklung beeinflussen, d.h. die

Hemmwirkung ist nicht artspezifisch, so daß ein Hemmstoff aus Haferspelzen die Keimung der verschiedensten Arten und Gattungen beeinträchtigen kann.

Aus den Abbildungen (1 und 2) geht außerdem hervor, daß die Empfindlichkeit der jeweiligen Saaten gegenüber der gleichen Konzentration an Hemmstoff deutlich variiert. Während bei Hafer und Rettich das Wachstum gegenüber den Wasserkontrollen relativ stark unterdrückt ist, zeigt sich bei den Karyopsen von Hirse nur eine weitaus geringere Hemmung. Dagegen ist bei den Samen von *Amaranthus caudatus* eine totale Unterdrückung der Keimung zu ersehen.

Diese Erscheinung darf jedoch nicht verallgemeinert werden, da es für die Keimung von großer Bedeutung ist, ob das Testsaatgut sich in der Keimruhe befindet oder nicht, d.h. ob im Testsaatgut selbst bereits mehr oder weniger endogene Hemmstoffe enthalten sind, was zu einer unterschiedlichen Reaktion bezüglich von außen zugesetztem Hemmstoffextrakt führen kann. Eine ähnliche Hemmwirkung konnte auch an Samen von weiteren Monokotylen wie etwa Gerste (*Hordeum spec. L.*) oder Glanz (*Phalleris spec.*) und dikotylen Pflanzen wie Gartenkresse (*Lepidium sativum L.*) durch einen bei Raumtemperatur gewonnenen wässrigen Spelzenextrakt nachgewiesen werden.

Da alle geprüften Samen qualitativ dasselbe Verhalten zeigen, d.h. in ihrer Keimung gehemmt werden (Unterschiede bestehen nur im Ausmaß der Hemmung), darf die universelle Wirksamkeit der Hemmstoffe angenommen werden.



Abb. 1: Wirkung eines Spelzenextraktes (Hitzeextraktion) unterschiedlicher Konzentration aus *Avena sativa* L. auf die Keimung von Samen monokotyler Pflanzen
links: *Avena sativa* L. rechts: Silberhirse (*Sorghum*)
von oben nach unten: Wasserkontrolle, Spelzenextrakt
(60 g Spelzen, 500 ml Wasser, Extrakt = ca. 400 ml)
3- fach konzentrierter Extrakt (Gefriertrocknung)



Abb. 2: Wirkung eines Spelzenextraktes (Hitzeextraktion) unterschiedlicher Konzentration aus *Avena sativa* L. auf die Keimung von Samen dikotyler Pflanzen
links: *Amaranthus caudatus* rechts: Rettich (*Raphanus*)
von oben nach unten: Wasserkontrolle, Spelzenextrakt
(60 g Spelzen, 500 ml Wasser, Extrakt = ca. 400 ml)
3- fach konzentrierter Extrakt (Gefriertrocknung)

2.2. Ausarbeitung eines geeigneten Biotestes

Für die Untersuchungen des aus Haferspелzen gewonnenen und die Keimung zahlreicher Samen hemmenden Extraktes, sowie der bei den weiteren Auftrennungs- und Anreicherungsschritten erhaltenen Eluate, war es zunächst erforderlich, einen geeigneten und genügend aussagekräftigen Biotest zu erarbeiten.

Gewöhnlich wird das Vorhandensein von natürlichen Keimungshemmstoffen durch Einlegen von Versuchssamen in teilweise gereinigte Pflanzenextrakte oder direkt in Pflanzensäfte bestimmt. Jeder qualitativ hochwertige Samen, der zwischen 90 - 100 % keimt, kann als Versuchsmaterial Verwendung finden. Nun haben aber Samen verschiedener Arten bzw. Gattungen unterschiedlich lange Keimdauer, die sich in manchen Fällen über einige Wochen und Monate erstrecken kann. Um aber im Laborversuch relativ rasch Aussagen über die Effektivität der jeweils durchgeführten Arbeitsschritte machen zu können, sollten Samen mit kurzer Keimdauer herangezogen werden. In unserem Fall erwiesen sich die entspelzten Samen von *Avena sativa* L., Sorte „Husar“ als gut geeignet. Das zertifizierte Saatgut zeichnete sich durch eine hohe Keimfähigkeit (Keimprozent über 90 %) aus.

Aus Vorversuchen war ersichtlich, daß unter den gegebenen Keimungsbedingungen (siehe Seite 72) bei den in Wasser gekeimten Karyopsen der Austritt der Keimwurzel ca. 20 Stunden nach der Aussaat erfolgte, wenige Stunden danach war auch das beginnende Wachstum der Koleoptile zu beobachten. Dasselbe Verhalten wurde auch beobachtet, wenn die Haferkörner nicht in dest. Wasser, sondern in mehr oder weniger stark konzentrierten hemmstoffhaltigen Lösungen gekeimt wurden, wobei aber dann sowohl das weitere Wachstum der Wurzeln als auch der Koleoptilen mehr oder minder stark gehemmt war. Diese Beobachtung stimmt mit denen von GROHNE (1950) und NIEMANN (1950) überein, die den Nachweis erbrachten, daß die keimungshemmende Wirkung genuiner Extrakte nur über eine Hemmung des Keimwurzelwachstums erfolgt. Nach KETRING (1975) finden jedoch viele Vorgänge im Samen statt,

ehe ein ersichtliches Wachstum erkennbar wird. Es ist daher nicht immer klar, ob diese Prozesse oder eine der folgenden Wachstumsphasen gehemmt werden.

Nach Austritt der Keimwurzel bzw. der Koleoptile war ein sehr rasches Wachstum sowohl für die Keimwurzel (ca. $28,2 \text{ mm} \pm 4 \%$) als auch für die Koleoptile (ca. $11,8 \text{ mm} \pm 6 \%$) bei den Wasserkontrollen bis zur 48. Stunde nach der Aussaat zu verzeichnen. Diese Wachstumsraten der beiden Pflanzenorgane wurden für die quantitativen Auswertungen der einzelnen Arbeitsschritte zugrunde gelegt, wobei die bei den Wasserkontrollen erhaltenen Längenwerte, die sich unter definierten Bedingungen als ziemlich konstant erwiesen, als 100 % gesetzt wurden. Nach den einzelnen Arbeitsschritten wurden die dabei erhaltenen Lösungen im Biotest überprüft und die gemessenen Längen der Primärwurzeln bzw. der Koleoptilen zunächst als prozentuale Werte, bezogen auf die Werte der jeweils parallel dazu durchgeführten Wasserkontrollen, ausgedrückt (Wachstum der Wurzeln bzw. der Koleoptilen als Funktion in Abhängigkeit von der Konzentration). Die auf diese Weise erhaltenen Wachstumswerte wurden dadurch in Hemmwerte umgewandelt, daß die Hemmung ausgedrückt wurde in 100 % - % Wachstum (in %, Hemmung der Wurzeln bzw. der Koleoptilen als Funktion in Abhängigkeit von der Konzentration). Zur Definition von Hemmeinheiten vergl. Seite 21.

Für die Untersuchungen der bei der HPLC - Trennung der Ätherphase pH 1,0 (siehe Seite 30) erhaltenen Eluate war der Biotest mit Haferkaryopsen weniger gut geeignet, da für die Keimtests nicht die erforderlichen Volumina an Testflüssigkeit (6ml) zur Verfügung standen. Deshalb wurden Samen, die sich durch ihre Kleinheit auszeichnen und mit denen daher ein entsprechender Biotest in kleinen Schalen mit geringerer Flüssigkeitsmenge (max. 1 ml) durchführbar wäre, zunächst einem Keimtest mit Wasser unterworfen, um ihre Brauchbarkeit zu prüfen. Die dabei verwendeten Samen von *Lobularia maritima*, *Verbascum densiflorum*, *Papaver somniferum*, *Papaver rupifragrum*, *Nicotina rustica* und *Digitalis ambigua* (alle bezogen vom Bot. Garten, München) erwiesen sich dabei als ungeeignet, da sie entweder

zu geringe Keimraten aufwiesen oder sich aber durch zu lange Keimdauer auszeichneten. Lediglich Samen von *Amaranthus caudatus* (Firma Dehner, Rain a. Lech) genügten diesen Anforderungen. Da es sich hierbei um eine dikotyle Pflanze handelt, erschien dabei nur die Messung der Wurzellängen für quantitative Aussagen als geeignet.

Ein ähnlicher, auf der Messung von Wurzellängen basierender Test wurde von GRIMM (1953) an Samen von Kresse erarbeitet, der auf den Arbeiten von MOEWUS (1949) beruht. Hierbei wurden aber die Kressesamen in mit Filtrierpapier ausgelegten Petrischalen in Wasser gekeimt und diese nach 19 - 25 Stunden Keimzeit (Wurzeln ca. 5 mm) in die zu testende Lösung umgebettet. In unserem Fall erfolgte die Aussaat direkt in die Testlösungen, so daß auch physiologische bzw. chemische Vorgänge, die eventuell bereits vor der sichtbaren Keimung ablaufen, mit erfaßt werden.

Bei allen quantitativen Untersuchungen wurden jeweils drei Bestimmungen mit je drei Petrischalen à 25 Karyopsen durchgeführt, so daß eine hinreichende statistische Absicherung der Meßwerte gewährleistet war.

2.3. Optimierung der Extraktionsbedingungen

2.3.1. Extraktion bei 27°C

Anfangs wurden Haferspелzen in Wasser 48 - 72 Stunden lang im Dunkeln extrahiert. Die mikroskopische Untersuchung der Extrakte zeigte eine intensive Bakterienentwicklung.

Bakterienwachstum in Extrakten von *Digitalis purpurea* L. und zahlreichen weiteren vegetabilischen Extrakten, u.a. aus Haferstroh und Haferschrot stellte GRIMM (1953) fest und konnte dabei zeigen, daß dem Aufbewahren der Extrakte bei Raumtemperatur eine Inaktivierung der Hemmwirkung durch bakterielle Prozesse innerhalb weniger Tage einhergeht. Zu ähnlichen Ergebnissen kam NIEMANN (1952) bei Extrakten aus Samen von *Foeniculum vulgare* MILLER und sieben weiteren Arten.

Dieses Bakterienwachstum konnte weitestgehend unterbunden werden, wenn dem zur Auslaugung der Hemmstoffe verwendeten dest. Wasser das Wachstum von Bakterien unterdrückende Substanzen wie Natriumazid bzw. Preventol in einer Konzentration von 100 mg/l zugesetzt wurden. Wässrige Lösungen von Natriumazid bzw. Preventol in obiger Konzentration erwiesen sich jedoch im Biotest mit Haferkaryopsen als stark keimungshemmend, wobei bei Natriumazid sowohl das Wurzel- als auch das Koleoptilenwachstum völlig unterdrückt wurden. Bei Preventol waren die Primärwurzeln max. 1 mm lang. Aus diesem Grund wurde von diesen Extraktionsmethoden Abstand genommen, da beim weiteren Arbeiten mit infizierten Extrakten eine Inaktivierung derselben zu befürchten, bzw. bei Extrakten, die bakterizide Substanzen enthielten, keine Aussagen über die extraktbezogene Hemmwirkung möglich waren.

2.3.2. Vergleich der Hemmwirkung der bei 4°C und durch Hitzeextraktion gewonnenen Extrakte.

Bei der kalten Extraktion (Kühlkammer) wurden 60 g Haferspелzen 48 Stunden bei 4°C in 400 ml dest. Wasser im Dunkeln extrahiert. Danach wurde der Extrakt (335 ml) abzentrifugiert und im Biotest überprüft. Bakterien waren in dieser Lösung nur vereinzelt nachzuweisen.

Parallel dazu wurden 60 g Spelzen in 500 ml Wasser 1 Stunde lang bei 100°C gekocht (die größere Wassermenge war erforderlich, um eine gleichmäßige Benetzung der Spelzen zu erzielen). Nach ELLIOTT und LEOPOLD (1952) handelt es sich bei dem Hemmstoff um eine hitzestabile Substanz, was auch in eigenen Versuchen bestätigt werden konnte. Nach Zentrifugation (Abtrennung von denaturiertem Protein und Verunreinigungen) wurde auch dieser Extrakt (394 ml) im Biotest eingesetzt. Die Meßwerte ergaben bei der kalten Extraktion eine Hemmung der Primärwurzel von ca. 20 %, bei der Hitzeextraktion dagegen eine Hemmung von ca. 55 %. Dieser Wert würde sich noch etwas erhöhen, wenn man gleiche Extraktionsvolumina zugrunde legt. Aus den Werten ist ersichtlich

daß bei der Hitzeextraktion wesentlich höhere Ausbeuten erzielt werden. Deshalb liegt allen Untersuchungen, soweit nicht anders angegeben, diese Methode zugrunde.

2.4. Grobbestimmung des Molekulargewichtes mittels Dialyse

Nach den Arbeiten von ELLIOTT und LEOPOLD (1952) sollte es sich bei dem aus Hafer erhaltenen Hemmstoff um ein nicht dialysierbares Polypeptid mit relativ hohem Molekulargewicht handeln. Nach KETRING (1973) stellen die meisten natürlich vorkommenden Keimungshemmstoffe überwiegend Substanzen mit ziemlich niedrigen Molekulargewichten dar. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde der Spelzenextrakt (Hitzeextraktion) im Dialyseversuch getestet.

Wird der Spelzenextrakt ca. 72 Stunden gegen dest. Wasser, welches häufig erneuert wird, dialysiert, so zeigt sich, daß nach der Dialysezeit von der ursprünglich vorhandenen Hemmaktivität von ca. 55 % im Rückstand nur noch ca. 9 % erhalten blieben. Dagegen läßt sich im Außenmedium (1 l Wasser) bereits nach 24-stündiger Dialysedauer nach Konzentrierung auf das Ausgangsvolumen eine Hemmwirkung von ca. 30 % nachweisen, die sicher durch Verlängern der Dialysezeit und häufigeres Wechseln des Außenmediums noch zu steigern wäre.

Zur Kontrolle wurde parallel dazu ein Spelzenextrakt bei 4°C aufbewahrt, der dann nach 72 Stunden im Biotest überprüft wurde und die gleiche Hemmwirkung wie frisch bereiteter Extrakt zeigte, so daß eine Inaktivierung während dieser Zeit auszuschließen ist.

Aus dem Dialyseverhalten des Extraktes ist also zu schließen, daß es sich nicht um hochmolekulare Hemmstoffe, sondern zumindest überwiegend um Substanzen mit relativ niedrigen Molekulargewichten handelt.

2.5. Reinigung und Anreicherung der Hemmstoffe

Um genauere Aussagen über die Art und chemische Beschaffenheit der Hemmstoffe machen zu können, war es erforderlich, diese durch

geeignete Methoden weitgehend von den verschiedenen Begleitsubstanzen abzutrennen. Untersuchungen lassen sich nur mit gereinigten Hemmstoffen sinnvoll durchführen und es sollte daher sicher sein, daß Fremdstoffe, die in der Lösung enthalten sind, keinen Einfluß auf die zu untersuchenden Eigenschaften haben.

2.5.1. Auftrennung des Haferspelzenextraktes mittels Gelfiltration an Acrylex - P 2

Bei der Gelfiltration des konzentrierten dunkelbraun gefärbten Spelzenextraktes (siehe Seite 74) werden im wesentlichen drei Fraktionen erhalten (siehe Abb. 3), wobei Fraktion I, die im Ausschlußvolumen erscheint und daher auf Grund des Molekülsiebeeffektes des Gels weitgehend höhermolekulare Substanzen enthält, und Fraktion II relativ sauber voneinander getrennt werden. Als Fraktion II, die hauptsächlich die braun gefärbten Komponenten enthält, wird ein Doppelpeak bezeichnet. Fraktion III enthält hellgelb gefärbte Komponenten und wird ebenfalls von der davor liegenden Fraktion relativ gut abgetrennt.

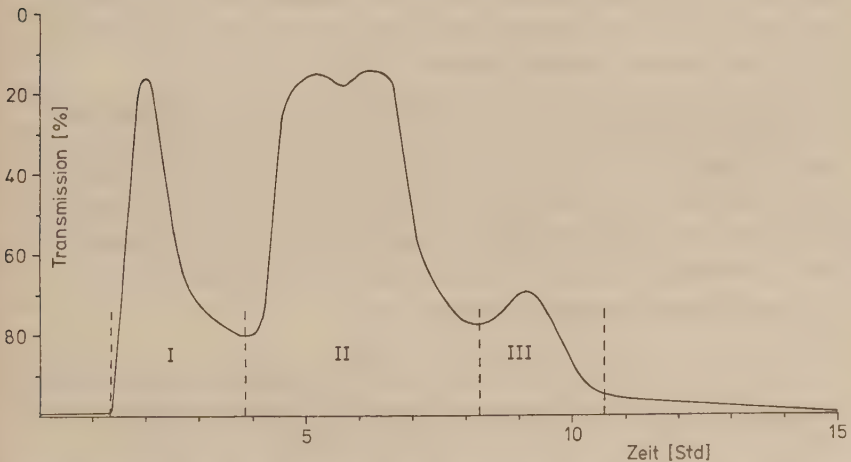


Abb. 3: Gelfiltration des Haferspelzenextraktes
an Acrylex - P 2

Eine weitergehende Auftrennung des Spelzenextraktes konnte durch Verdoppelung der Höhe des Gelbettes bei gleichbleibender Durchflußgeschwindigkeit nicht erzielt werden.

Ebenfalls unbefriedigend blieb eine Auftrennung des Rohextraktes durch Gelfiltration an Bio - Gel - P 2 Säulen (siehe Seite 74, Länge der Säule: 1 m, Ø 1 cm), die dazu noch den Nachteil hatte, daß nur geringe Volumina aufgetragen werden konnten.

Nach Einengen der jeweiligen Fraktionen wurden diese in einer Verdünnungsreihe dem Biotest mit Haferkaryopsen unterworfen und dabei folgende Hemmkurven erhalten (siehe Abb. 4, Seite 19 und Tabellen 9 - 11, Seite 90 und 91).

Allen drei Fraktionen gemeinsam ist dabei, daß sie im Bereich geringer Konzentration keine oder nur geringe Hemmwirkung zeigen. Für Fraktion III ist sogar eine leicht fördernde Wirkung auf das Wurzelwachstum über nahezu den gesamten getesteten Konzentrationsbereich feststellbar, so daß anzunehmen ist, daß es sich hierbei um Substanzen handelt, die innerhalb definierter Konzentrationsbereiche eine antagonistische Wirkung gegenüber den daneben vorliegenden Hemmstoffen ausüben. Bei Fraktion II zeigen sich die Primärwurzeln stärker gehemmt als die Koleoptilen, während in den Fraktionen I und III die Koleoptilen gegenüber den Wurzeln stärker gehemmt sind.

Ganz deutlich geht aus der Abbildung hervor, daß die Hauptaktivität der Hemmstoffe in Fraktion II zu finden ist. Da diese Fraktion aber erst nach dem Ausschlußpeak (der die höhermolekularen Substanzen enthält, da die Ausschlußgrenze von Acrylex-P 2 bei ca. 2000 Daltons liegt) erscheint, ist ein weiterer Hinweis gegeben, daß die Hemmstoffe Substanzen mit relativ niedrigem Molekulargewicht darstellen.

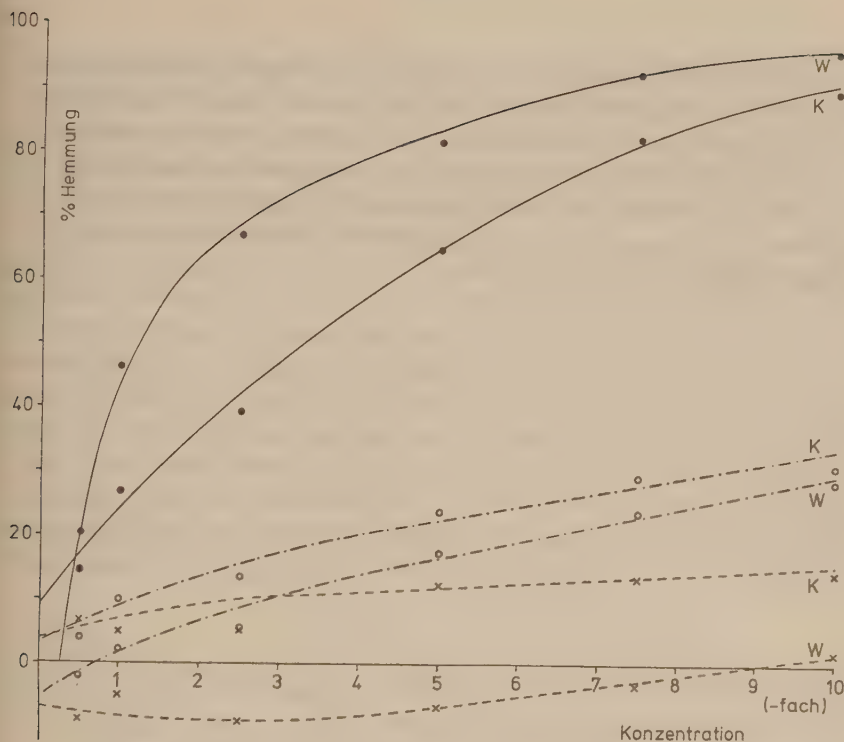


Abb. 4: Darstellung der Hemmung des Wurzel- und Koleoptilenwachstums durch die bei der Gelfiltration des Spelzenextraktes an Acrylex - P 2 erhaltenen Fraktionen I - III (Konzentration bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes) ○—○ Fraktion I; ●—● Fraktion II; x—x Fraktion III; W = Wurzel; K = Koleoptile

2.5.2. Auftrennung der Fraktion II der Gelfiltration durch Ausschütteln mit Äther bei verschiedenen pH - Werten

Um zu prüfen, ob es sich bei den Hemmstoffen um neutrale, saure, basische oder mit Äther nicht ausschüttelbare Komponenten handelt, wurde die durch Gefriertrocknung konzentrierte Fraktion II

der Gelfiltration an Acrylex - P 2, die wie vorstehend gezeigt wurde, den Hauptanteil an Hemmstoffen enthält, nacheinander bei pH 7,0 und pH 1,0 mit dest. Äther (siehe Seite 75) ausgeschüttelt. Die Ätherphase pH 7,0 ergab nur eine ganz schwach gelblich gefärbte Lösung, die Ätherphase pH 1,0 zeigte eine gelbe Farbe und alle braun gefärbten Komponenten verblieben in der wässrigen Phase.

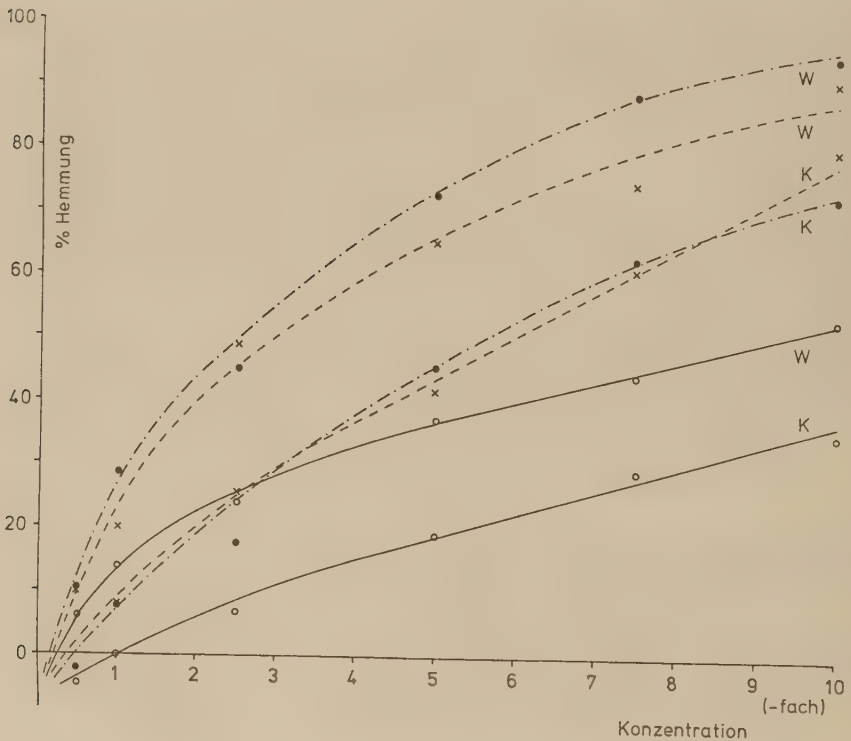


Abb. 5: Darstellung der Hemmung des Wurzel- und Koleoptilenwachstums durch die durch Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration mit Äther erhaltenen Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0 und der verbleibenden wässrigen Phase (Konzentration bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes) o—o pH 7,0; •—• pH 1,0; x—x wässrige Phase; W = Wurzel, K = Koleoptile

In Vorversuchen konnte durch Überprüfung im Biotest gezeigt werden, daß bei pH 11,0 - 12,0 keine Hemmsubstanzen ausgeschüttelt werden können, so daß basische Komponenten nicht für die Hemmwirkung verantwortlich sind. Die nach dem Ausschütteln mit Äther aus dem Biotest resultierenden Hemmkurven sind in Abbildung 5 (siehe Seite 20) dargestellt.

In allen drei Phasen sind die Primärwurzeln der Haferkaryopsen stärker gehemmt als die Koleoptilen. Die graphische Darstellung der Hemmwirkung vor allem in der Ätherphase pH 1,0 und der wässrigen Phase zeigen die Form von Sättigungskurven. Aus der Darstellung ist ersichtlich, daß die Hemmstoffe nicht einer einzigen Stoffklasse angehören, sondern daß überwiegend wahrscheinlich organische Säuren und durch Äther nicht ausschüttelbare Substanzen für die Hemmwirkung verantwortlich sind. Lipophile Neutralsubstanzen scheinen demnach eine geringere Rolle zu spielen. Diese sollten auch bei pH 7,0 in die Ätherphase übergehen.

2.5.3. Ermittlung der quantitativen Verteilung der Hemmwirkung auf die bei den Auftrennungsschritten erhaltenen Fraktionen durch Berechnung von Hemmeinheiten .

Da es sich bei den Hemmkurven der bisher durchgeführten Trennschritte um mehr oder minder ausgeprägte Sättigungskurven (siehe jeweilige Abbildung) handelt, sollten sich diese ähnlich wie bei den Enzymkinetiken in der Proteinchemie in einer Art von Lineweaver - Burk - Diagramm in Form von Geraden darstellen lassen.

Dazu wurden sowohl von den jeweils getesteten Konzentrations-schritten als auch von den dazugehörigen prozentualen Hemmwer-ten für die Primärwurzeln zunächst die Reziprokwerte gebildet (siehe Tabellenanhang). Aus den nachfolgenden Abbildungen ist zu entnehmen, daß für die höheren Konzentrationsbereiche eine Darstellung der Hemmwirkung in Form von Geraden gut durchführ-bar ist. Für die niedrigeren Konzentrationswerte ist diese Me-

thode nicht geeignet, da durch die Reziprokdarstellung starke Streuungen auftreten.

Als Bezugspunkt für die Berechnung der Hemmeinheiten wurde der Wert von 20 % Hemmung willkürlich angenommen. Es könnte aber dazu auch jeder andere Wert dienen, der innerhalb der linearen Darstellung der Reziprokwerte als gesichert anzunehmen ist. Aus den Graphiken wird der Reziprokwert der Konzentration erhalten, bei der 20 % Hemmung erreicht werden. Aus diesen Werten kann durch reziproke Umformung die korrespondierende Konzentration ermittelt werden, die zu 20 % Hemmung führt.

Durch Division des Volumens des Haferspelzenextraktes (ca. 600 ml), das immer als Bezugsbasis diente, durch die errechnete Konzentration, errechnet sich ein Volumen, bei dem eine Hemmung des Wachstums der Primärwurzel der Haferkaryopsen von 20 % erreicht wird. Dieses Volumen wird dann durch 6 dividiert, da pro Petrischale 6 ml an Testlösung eingesetzt wurden und der daraus resultierende Wert gibt die Anzahl der Hemmeinheiten, die in der jeweiligen Lösung enthalten sind, an.

Zunächst war es aber erforderlich, die Hemmkurven des Haferspelzenextraktes und der nach der Gefriertrocknung desselben erhaltenen konzentrierten und im Biotest durch Verdünnungsreihe überprüften Lösungen aufzustellen (siehe Abbildung 6, Seite 23).

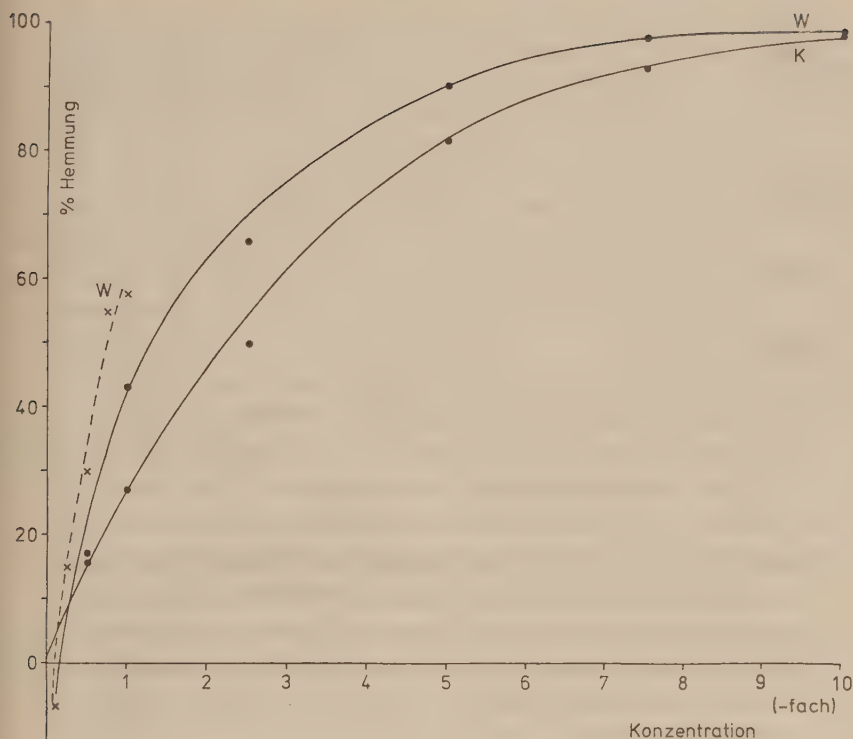


Abb. 6: Darstellung der Hemmung des Wurzel- und Koleoptilenwachstums durch Spelzenextrakt und der daraus nach Gefriertrocknung erhaltenen Lösung (Konzentration bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes)
 x - - - x Spelzenextrakt; • — • Spelzenextrakt nach Gefriertrocknung; W = Wurzel, K = Koleoptile

Aus der Abbildung 7 (siehe Seite 24) läßt sich für den Rohextrakt für $1/C$ (C = Konzentration) ein Wert von 3,2 ermitteln. Dieser wird durch Extrapolation der durch die Meßpunkte bestimmten Geraden erhalten.

Für die nach der Gefriertrocknung des Rohextraktes erhaltene Lösung wird ein Wert von 2,7 bestimmt.

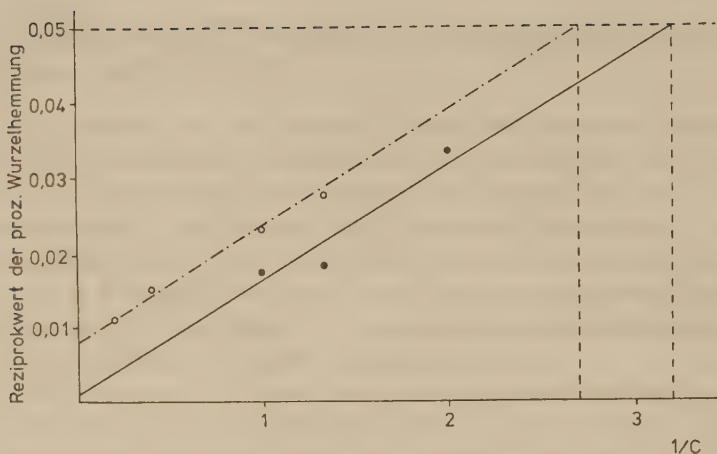


Abb. 7: Ermittlung der reziproken Konzentrationswerte des Spelzenextraktes und der nach dessen Gefriertrocknung erhaltenen Lösung, die eine Hemmung des Wurzelwachstums der Haferkaryopsen von 20 % bewirken (C = Konzentration)
 • — • Spelzenextrakt; o — o Spelzenextrakt nach Gefriertrocknung

Aus Abbildung 8 (siehe Seite 25) lassen sich für die bei der Gelfiltration des Spelzenextraktes an Acrylex - P 2 erhaltenen Fraktionen I und II die reziproken Konzentrationswerte von 0,175 für Fraktion I und 2,45 für Fraktion II ermitteln. Für Fraktion III kann deshalb kein Wert angegeben werden, da eine Hemmwirkung von 20 % über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich nicht erreicht wird (siehe auch Abb. 4, Seite 19).

Aus Abbildung 9 (siehe Seite 25) können die reziproken Konzentrationswerte für die durch Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration, die den Hauptanteil an Hemmwirkung enthält, bei verschiedenen pH - Werten erhaltenen Lösungen entnommen werden. Hierbei werden die $1/C$ - Werte für pH 7,0 = 0,57, für pH 1,0 = 1,05 und für die verbleibende wässrige Phase = 0,91 ermittelt.

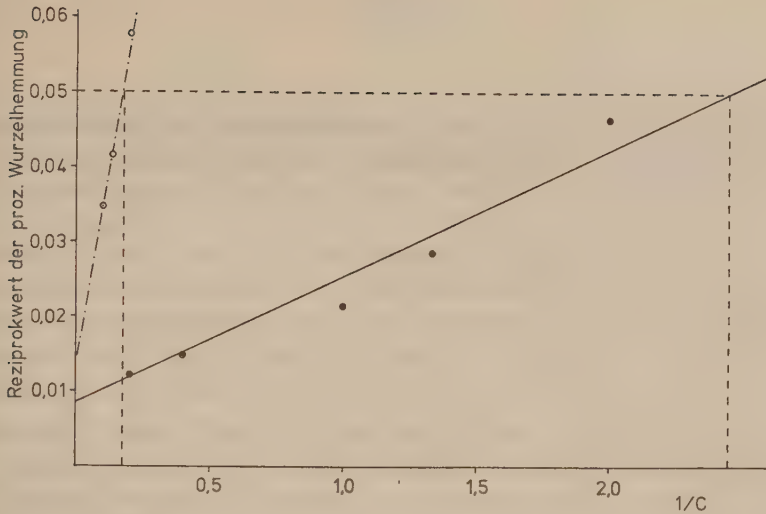


Abb. 8: Ermittlung der reziproken Konzentrationswerte der bei der Gelfiltration des Spelzenextraktes an Acrylex - P 2 erhaltenen Fraktionen I und II, die eine Hemmung des Wurzelwachstums der Haferkaryopsen von 20 % bewirken.
 ○ — — ○ Fraktion I; ● — — ● Fraktion II;

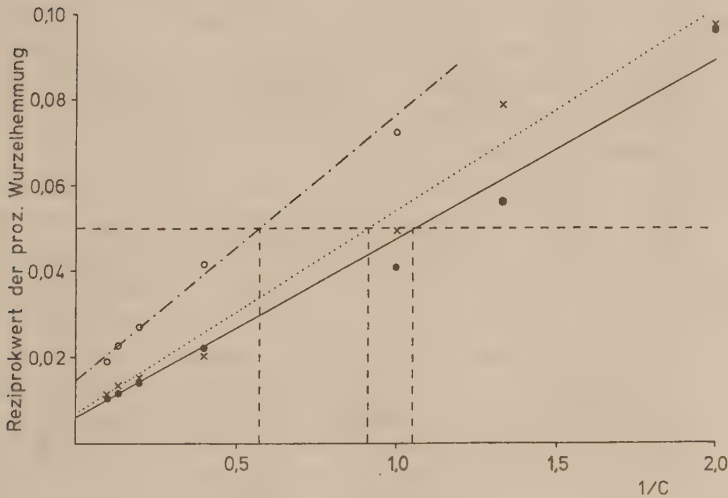


Abb. 9: Ermittlung der reziproken Konzentrationswerte der durch Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration des Spelzenextraktes an Acrylex - P 2 mit Äther erhaltenen Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0 und der verbleibenden wässrigen Phase (C = Konzentration) ○ — — ○ Ätherphase pH 7,0; ● — — ● Ätherphase pH 1,0; x.....x wässrige Phase;

In Tabelle I ist die Berechnung der Hemmeinheiten aller bisher durch Trennungsschritte erhaltenen Lösungen dargestellt.

Tabelle I: Berechnung der Hemmeinheiten

Art der Lösung	1/C	C	600/C (ml)	Volumen (ml) : 6 = Anzahl d. Hemm- einheiten
Haferspelzenextrakt	3,2	0,3125	1920	320
Speizenextrakt nach Gefrier Trocknung	2,7	0,3704	1620	270
Gelfiltration an Acrylex - P 2				
Fraktion I	0,175	5,7143	105	18
Fraktion II	2,45	0,4082	1470	245
Σ I + II				263
Ausschütteln bei versch. pH - Werten				
pH 7,0	0,57	1,7544	342	57
pH 1,0	1,05	0,9524	630	105
wässr. Phase	0,91	1,0989	546	91
Σ pH 7,0 + pH 1,0 + wässr. Phase				253

1/C = Reziprokwert, derjenigen Konzentration einer Lösung, die eine Hemmung des Wurzelwachstums der Haferkaryopsen um 20 % bewirkt.
 600/C = Division des Volumens des Speizenextraktes (= 600 ml) durch die ermittelte Konzentration, die zu einer 20 % - igen Hemmung des Wurzelwachstums führt (siehe auch Erklärung im Text, Seite 21).

Aus Tabelle I ist zu entnehmen, daß in dem durch Hitzeextraktion von 90 g Haferspелzen erhaltenen Extrakt (ca. 600 ml) 320 Hemmeinheiten ermittelt werden, nach Gefriertrocknung desselben dagegen nur noch 270 Hemmeinheiten, was vermuten läßt, daß im Vakuum relativ leicht flüchtige Substanzen verloren gehen. Dies konnte auch durch eine Wasserdampfdestillation bestätigt werden. Nach Ausschütteln des Destillates und Entfernen des Äthers wurde eine stechend riechende Lösung erhalten, die im Biotest Hemmwirkung hervorrief.

Fraktion I ergibt nur eine geringe Anzahl von Hemmeinheiten. Da diese Fraktion aber die höhermolekularen Substanzen enthält, ist anzunehmen, daß Proteine oder Polypeptide mit relativ hohem Molekulargewicht für die Hemmwirkung nicht verantwortlich sind. Der Wiederfund von 263 Hemmeinheiten (Fraktion I + Fraktion II) gegenüber 270 Hemmeinheiten beträgt 97 %, d.h. daß praktisch keine Verluste auftreten und daß Fraktion III im getesteten Konzentrationsbereich keine Hemmwirkung aufweist.

Ein Vergleich der nach Ausschütteln der Fraktion II der Gel-filtration des Spelzenextraktes bei verschiedenen pH - Werten erhaltenen Ätherphasen sowie der verbleibenden wässrigen Phase zeigt, daß vor allem in der Ätherphase pH 1,0, daneben aber auch in der wässrigen Phase die Hauptmengen an Hemmeinheiten zu finden sind. Die Summe der Hemmeinheiten aus diesen drei Phasen ergibt 253 Einheiten und liegt damit über dem Wert von 245 Hemmeinheiten der Fraktion II der Gelfiltration, aber diese 8 Einheiten, die zuviel gefunden werden, liegen im Rahmen der Fehlergrenze. Aus einem Wiederfund von praktisch 100 % ist aber auch zu schließen, daß basische Komponenten als Keimungshemmstoffe nicht in Frage kommen können, da in der im basischen Milieu ausgeschüttelten Ätherphase keine Hemmwirkung gefunden werden konnte.

2.5.4. Orientierende Versuche zur hochdruckflüssigchromatographischen Trennung von Keimungshemmstoffen enthaltenden Fraktionen

2.5.4.1. Gelchromatographische Trennung mit CPG 10 (Controlled Pore Glass) sowie gel- und adsorptionschromatographische Trennung an Lichrosorb SI 100

Nachstehende Fraktionen wurden einem Trennversuch unterzogen:

- Probe I : Fraktion II der Gelfiltration des Haferspелzenextraktes an Acrylex - P 2
- Probe II : Ätherphase pH 7,0
- Probe III : Ätherphase pH 1,0
- Probe IV : nach Ausschütteln der Fraktion II bei pH 7,0 und pH 1,0 verbleibende wässrige Phase

Elutionsmittel und Bedingungen siehe Seite 76.

Auf CPG 10 wird mit der Probe IV (die relativ viele Hemmeinheiten enthält) nur eine partielle Trennung von zwei Komponenten erreicht. Dies kann auf die relativ kleine Bodenzahl der Säule auf Grund der Teilchengröße des Füllmaterials zurückgeführt werden. Bei Verwendung der 5 μ Partikel des Lichrosorb SI 100 ergibt sich eine bessere Trennung durch die höhere Bodenzahl der Säule. Die hier zusätzlich auftretenden adsorptiven Einflüsse wirken sich gegenüber der reinen gelchromatographischen Trennung auf CPG - Säulen trennverbessernd aus. Mit zunehmendem Alkoholanteil des Elutionsmittels wird die Trennung verbessert. Die beste Trennung unter den gegebenen Bedingungen wurde mit dem Elutionsmittelgemisch: Methanol / Wasser = 80 / 20 erreicht. In Abbildung 10 (siehe Seite 29) sind die Trennungen der Proben I bis IV gegenübergestellt. Neben den in allen vier Proben vorhandenen Hauptkomponenten sind teilweise noch partielle Trennungen weiterer Komponenten zu erkennen.

Die Retentionszeiten schwanken bei Wiederholungsmessungen

zwischen 0,2 und 0,4 Minuten. Es ist deshalb nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die den beiden Hauptpeaks zuzuordnenden Komponenten in allen vier Proben die gleichen sind. Dies ist für die Proben II und III anzunehmen. Dagegen sollte die Probe IV alle diejenigen Substanzen enthalten, die sich beim Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration mit Äther bei verschiedenen pH - Werten nicht in die entsprechenden Ätherphasen überführen lassen (die Ätherphase pH 7,0 zeigt schwach gelbliche Färbung, die Ätherphase pH 1,0 ist gelb gefärbt, die wässrige Phase hat eine braune Färbung).

Die Änderung der Peakflächenverhältnisse in den Chromatogrammen zeigt bei den beiden Ätherextrakten gegenüber dem Verhältnis der Fraktion II der Gelfiltration, daß durch das Ausschütteln mit Äther bei verschiedenen pH - Werten die Komponente A in der Probe II angereichert und die Komponente B in der Probe III sehr stark angereichert wird.

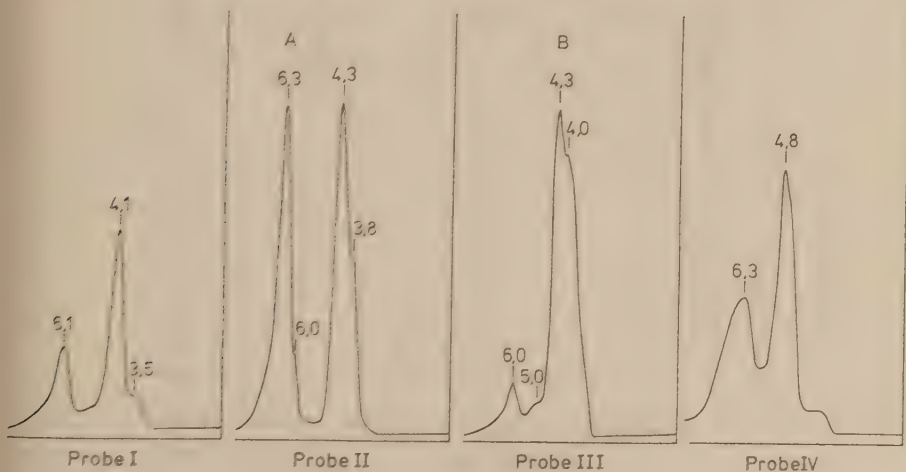


Abb. 10: Auftrennung der Fraktion II der Gelfiltration an Acrylex - P 2 und der daraus bei verschiedenen pH - Werten ausgeschüttelten Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0, sowie der verbleibenden wässrigen Phase an Lichrosort SI 100 (Die über den Peaks stehenden Zahlen geben die Retentionszeiten in min an, Detektion: UV - Absorption bei 240 nm)

2.5.4.2. Trennung der Ätherphase pH 1,0 mittels HPLC - Technik an Reverse - Phase - Gel

Da eine zufriedenstellende Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 durch hochdruckflüssigchromatographische Trennung an Lichrosorb SI 100 nicht erzielt werden konnte, wurde eine solche an Reverse Phase 33951 / μ C 18 (Fa. Waters) durchgeführt (siehe Seite 77). Hierbei konnte durch Anwendung eines Methanol - Wasser - Gradienten ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden.

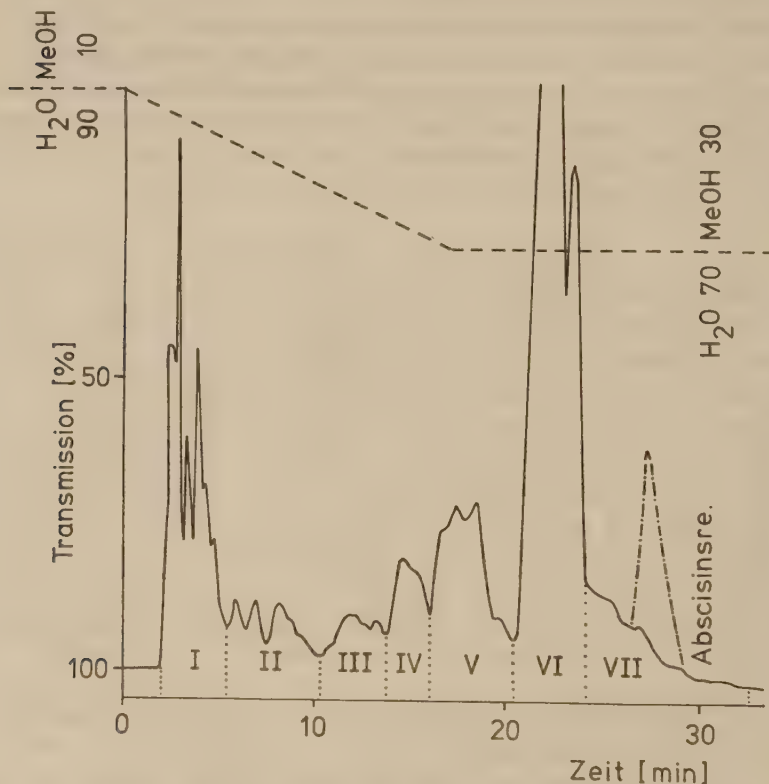


Abb. 11: Elutionsdiagramm der Hochdruckflüssigchromatographie der Ätherphase pH 1,0 an Reverse - Phase - Gel
--- Verlauf des Elutionsmittelgradienten

Das in Abbildung 11 (siehe Seite 30) dargestellte Elutionsdiagramm zeigt, daß dabei sieben relativ gut voneinander getrennte Fraktionen erhalten werden.

Alle Fraktionen wurden im Biotest mit Samen von *Amaranthus caudatus* überprüft (siehe Seite 72). Eine Verwendung von *Avena*-Karyopsen war nicht möglich, da nicht genügend aufgetrenntes Material gewonnen werden konnte. Zur Durchführung des Biotestes wurden 4 x je 50 µl einer 200 - fach konzentrierten Ätherphase pH 1,0 (Konzentration bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes) gespritzt und die entsprechenden Fraktionen nach Entzug des Methanols gefriergetrocknet und dann in je 4 ml dest. Wasser aufgenommen ($\hat{=}$ 10 - facher Konzentration bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes). Für den Biotest wurden dann je 1 ml Lösung pro Petrischale eingesetzt. Die quantitative Auswertung der Meßergebnisse ist in Tabelle II dargestellt.

Fraktionsnummer	Wachstum %	Hemmung %
H ₂ O	100,0	0,0
Fraktion I	80,0	20,0
Fraktion II	89,5	10,5
Fraktion III	90,2	9,8
Fraktion IV	78,4	21,6
Fraktion V	73,0	27,0
Fraktion VI	24,1	75,9
Fraktion VII	73,7	26,3

Tab. II: Quantitative Auswertung der Hemmwirkung der bei der Trennung der Ätherphase pH 1,0 an Reverse - Phase - Gel erhaltenen Fraktionen (Einspritzmenge: 50 µl einer 200 - fach konz. Ätherphase pH 1,0 $\hat{=}$ 1 ml eines 10 - fach konz. Spelzenextraktes)

Die stärkste Hemmwirkung wird in Fraktion VI erreicht, die wie

aus Abbildung 11 zu entnehmen ist, keine einheitliche Substanz darstellt, sondern auf Grund des Doppelpeaks mindestens aus zwei voneinander verschiedenen Substanzen besteht. Daneben wird aber auch in den übrigen Fraktionen mehr oder minder starke Hemmwirkung gefunden, d.h. aber, daß in der Ätherphase pH 1,0 nicht eine einzelne Substanz für die Hemmwirkung verantwortlich ist, sondern daß eine ganze Reihe unterschiedlicher Stoffe an der Hemmung des Wachstums der Wurzel beteiligt sind.

2.5.5. Auftrennung der Ätherphase pH 7,0

In der Ätherphase pH 7,0 war zwar nur wenig Hemmstoff vorhanden (vergl. Tabelle I, Seite 26). Es erhob sich aber die Frage, ob hier andere Komponenten vorlagen als in der Ätherphase pH 1,0 oder ob ein Teil der organischen Säuren nur in diese Fraktion hinübergeschleppt worden ist.

Die zur Auftrennung verwendete Ätherphase pH 7,0 wurde durch wässrige Extraktion der Spelzen bei 4°C über einen Zeitraum von 48 Stunden und anschließendes dreimaliges Ausschütteln mit dest. Äther erhalten. Als Ausgangsmaterial dienten dazu die Spelzen des auch für die Keimtests verwendeten Saathafers, daneben aber auch das Spelzenmaterial, das bei der maschinellen Abtrennung der Karyopsen (siehe Seite 70) als Abfallprodukt übrigbleibt. In beiden Ausgangsmaterialien konnte die keimungshemmende Wirkung des Extraktes nachgewiesen werden.

2.5.5.1. Auftrennung auf Celluloseplatten

Die analytische Trennung erfolgte durch punktförmiges Auftragen und Entwickeln der Chromatogramme in einem Fließmittel mit variierenden Anteilen an n - Hexan und Butanon. Bei Verwendung eines Fließmittelgemisches, das geringe Anteile an Butanon enthielt, konnte eine Auftrennung in zwei unterschiedlich große Substanzflecke erzielt werden, wobei der größere je nach Anteil des zugesetzten Butanons unterschiedliche R_f - Werte aufwies (siehe Abb. 12, Seite 33).

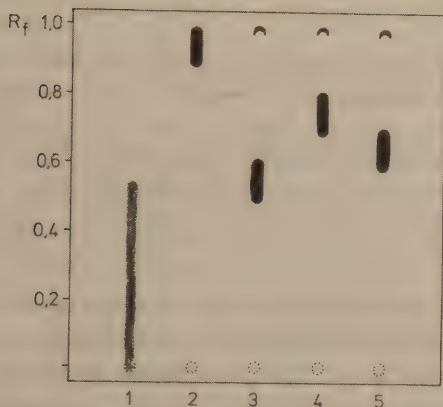


Abb. 12: Dünnschichtchromatogramm der Ätherphase pH 7,0
(Celluloseplatte)

Fließmittel: 1 = n - Hexan

2 = Butanon

3 = n - Hexan : Butanon = 100 : 1

4 = n - Hexan : Butanon = 97 : 3

5 = n - Hexan : Butanon = 98 : 2

Daneben erfolgte auch eine präparative Trennung der Ätherphase pH 7,0 mit den Fließmitteln 3 bis 5 (vergl. Abb. 12) auf Celluloseplatten, wobei die Lösung bandförmig aufgetragen wurde. Hierbei wurde dieselbe Trennung erhalten wie bei punktförmigem Auftragen der Ätherphase pH 7,0. Nach Entwicklung der Chromatogramme wurden die am Start sitzenbleibenden Substanzen, die unter UV - Licht absorbierende breite Bande und die dazwischens liegende Zone und die Front getrennt von den Platten abgekratzt, eluiert und im Biotest auf ihre Hemmwirkung überprüft. In allen Fällen ergab nur die unter UV - Licht absorbierende breite Bande eine Hemmung des Wurzel- und Koleoptilenwachstums der Haferkaryopsen, die anderen Zonen zeigten dagegen dieselben Wurzel- bzw. Koleoptilenlängenwerte wie die Wasserkontrollen, d.h. aber, falls nicht nur eine einzelne Hemmsubstanz vorliegt, sondern mehrere Substanzen, daß mit den getesteten Fließmitteln eine Auftrennung nicht erzielt werden kann.

2.5.5.2. Auftrennung auf Kieselgelplatten

Bei der Dünnschichtchromatographie der Ätherphase pH 7,0 auf Kieselgelplatten erwiesen sich die Fließmittel Benzol : Aceton = 90 : 10 und Toluol : Chloroform : Aceton = 40 : 25 : 35 als gut brauchbar.

Eine Auftrennung der Ätherphase pH 7,0 aus den Haferspelzen des zum Biotest verwendeten Saatgutes, des Mühlenabfallproduktes und aus Spelzen von Flughafner (*Avena fatua* L.) zeigten sowohl unter UV - Licht als auch nach Anfärben der Platten dieselben Substanzflecke (siehe Abb. 13). Daraus ist zu schließen, daß es sich bei den in den jeweiligen Lösungen enthaltenen Inhaltsstoffen mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl bei den Kulturhafersorten als auch beim Wildhafer um dieselben Substanzen handelt.

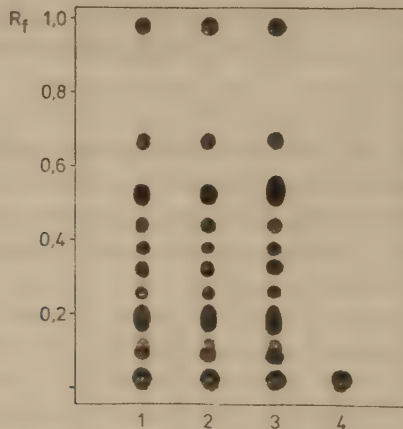


Abb. 13: Dünnschichtchromatographie von Ätherphasen pH 7,0 aus Haferspelzen verschiedener Sorten

1 = Haferspelzen des Saatgutes Sorte „Husar“

2 = Haferspelzen des Mühlenabfallproduktes

3 = Haferspelzen von Wildhafer (*Avena fatua* L.)

4 = p - Cumarsäure

Bei der zur Sichtbarmachung der Flecken verwendeten diazotierten Sulfanilsäure (nach STAHL, 1962) handelt es sich aber um ein nicht spezifisches Sprühreagens, so daß Aussagen über die Zugehörigkeit der beobachteten Substanzen zu einer bestimmten Stoffklasse nicht gemacht werden können.

Bei der präparativen Trennung dieser Ätherphase konnte gezeigt werden, daß nach dem Eluieren der Substanzen von der Kieselgelplatte die Substanzen, die beim Entwickeln des Chromatogrammes am Startpunkt sitzenbleiben, im Keimtest keine Wirkung hervorrufen. In dem Bereich zwischen Start und $R_f = 0,33$ konnte eine Anzahl von mindestens sechs Substanzen nachgewiesen werden. Dieser Bereich war in der Lage, die Keimfähigkeit der Haferkaryopsen gegenüber den Wasserkontrollen deutlich zu verringern. p-Cumarsäure (die von BÖRNER in der sauren Ätherfraktion gefundene Hauptkomponente), die beim Ausschütteln des Spelzenextraktes mit Äther überwiegend in die Ätherphase pH 1,0 übergehen sollte, läuft in dem verwendeten Fließmittel nur eine ganz geringe Strecke über den Startpunkt hinaus.

Zwischen $R_f = 0,33$ und der Fließmittelfront konnten nochmals einige Substanzen, darunter eine im UV- Licht stark fluoreszierende, festgestellt werden, deren keimungshemmende Wirkung im Vergleich zum unteren Hemmbereich wesentlich schwächer ausgeprägt war. Eine Auftrennung des Bereiches zwischen Start und $R_f = 0,33$ in zwei Teilbereiche führte zu einer jeweils verminderten Keimungshemmung. Auf Grund dieser Versuche ist anzunehmen, daß auch in dieser Fraktion, ähnlich wie in der Ätherfraktion pH 1,0 mehrere Substanzen am Zustandekommen der Hemmwirkung beteiligt sind.

2.5.5.3. Auftrennung der Ätherphase pH 7,0 mittels Hochspannungselektrophorese

Da nach den bisherigen Untersuchungen nicht geklärt wurde, ob es sich bei den Hemmstoffen in der Ätherphase pH 7,0 für die Hemmwirkung verantwortlichen Hemmstoffe um Neutralsubstanzen

oder aber vielleicht um organische Säuren, die bereits beim Ausschütteln im neutralen Milieu teilweise in die Ätherphase übergehen (schwache organische Säuren) handelt, wurde die Ätherphase pH 7,0 einer Papierelektrophorese (siehe Seite 78) unterzogen. Getestet wurden sowohl der nach der Elution von der Dünnschichtplatte (Kieselgel) erhaltene untere Hemmbereich (Start bis $R_f = 0,33$) als auch der obere Hemmbereich ($R_f = 0,33$ bis Front) der auch eine unter UV - Licht fluoreszierende Bande enthält. Das dabei erhaltene Chromatogramm ist in Abb. 14 dargestellt.

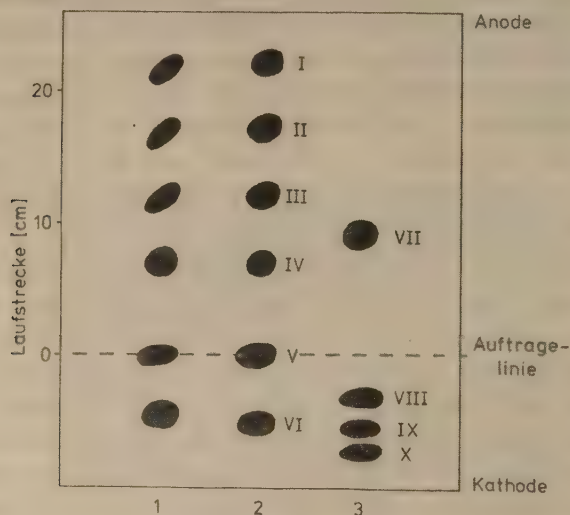


Abb. 14: Hochspannungselektrophorese der Ätherphase pH 7,0
 1 = Ätherphase pH 7,0
 2 = unterer Hemmbereich
 3 = oberer Hemmbereich
 (2 und 3 nach DC - Chromatographie auf Kieselgelplatte)

Aus Abb. 14 ist ersichtlich, daß bei den Substanzen des unteren Hemmbereiches neben neutralen, eine Reihe weiterer Substanzen vorliegt, die unter den gegebenen Bedingungen zur Anode

laufen, also negativ geladen sind und daher in die Gruppe der Säuren einzuordnen wären.

Daneben konnte aber auch eine zur Kathode wandernde Substanz ermittelt werden. Bei den Substanzen des oberen Hemmbereiches konnten drei ermittelt werden, die zur Kathode liefen (darunter die fluoreszierende) und eine, die zur Anode wanderte.

Die präparative Hochspannungselektrophorese zeigte dasselbe Bild. Nach Eluieren der einzelnen Zonen wurden diese im Bio-test überprüft. Dabei zeigen Zone I und II eine schwache, Zone III und IV keine Hemmwirkung. Starke Keimungshemmung wurde dagegen bei den am Start sitzenbleibenden Substanzen festgestellt, d.h. daß es sich dabei um bei pH 6,1 ungeladene Stoffe handelt, die in überwiegendem Maße für die Hemmwirkung der Ätherphase pH 7,0 verantwortlich sind. Bei den Substanzen des oberen Hemmbereiches zeichnete sich nur die Zone IX durch eine geringe Hemmwirkung aus.

2.5.5.4. Auftrennung der neutralen Substanzen der Ätherphase

pH 7,0

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die für die keimungshemmende Wirkung verantwortlichen, in der Ätherphase pH 7,0 enthaltenen Substanzen überwiegend Neutralsubstanzen darstellen, war eine Möglichkeit gegeben, die geladenen Substanzen mittels Ionenaustauscherchromatographie abzutrennen. Hierzu diente die Ionenaustauscherchromatographie an einem Mischbett-austauscher (siehe Seite 78), wobei sowohl die in der Lösung enthaltenen sauren als auch basischen Komponenten gebunden werden, neutrale Stoffe dagegen ungehindert das Gelbett passieren. Nach der Chromatographie konnten die Neutralsubstanzen wieder mit Äther ausgeschüttelt und der dünn-schicht-chromatographischen Trennung auf Kieselgelplatten unterworfen werden. Hierzu wurden verschiedene Fließmittel auf ihre Brauchbarkeit überprüft. Die dabei erhaltenen Trennungen sind in Abb. 15 (siehe Seite 38) dargestellt. Die beste Trennung wurde dabei mit einem Benzol - Essigester - Gemisch = 50 : 50 erhalten.

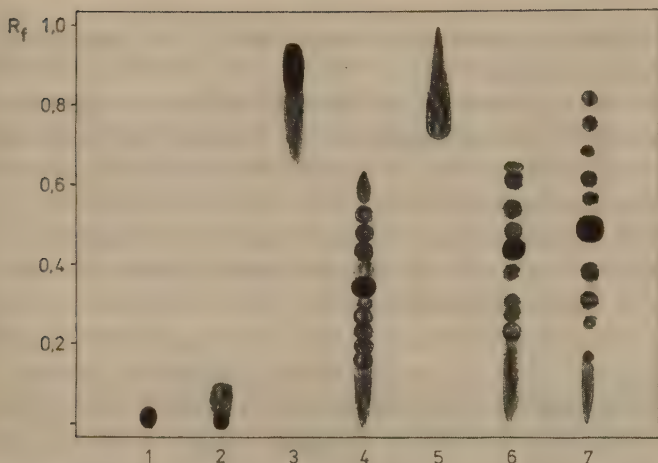


Abb. 15: Dünnschichtchromatographie der Neutralsubstanzen der Ätherphase pH 7,0 auf Kieselgelplatte

Fließmittel: 1 = Petroläther : Diäthyläther = 90 : 10

2 = Petroläther : Diäthyläther = 90 : 10 + 1 ml
Eisessig

3 = Benzol : Aceton = 50 : 50

4 = Benzol : Aceton = 80 : 20

5 = Essigester : Butanon : Ameisensäure : H_2O =
50 : 30 : 10 : 10

6 = Toluol : Chloroform : Aceton = 40 : 25 : 35

7 = Benzol : Essigester = 50 : 50

Nach der präparativen Trennung der Neutralsubstanzen der Ätherphase pH 7,0 in Fließmittel Nr. 7 wurden die dabei erhaltenen Banden nach deren Lokalisierung einzeln eluiert und im Biotest mit Haferkaryopsen überprüft. Hierbei zeigte sich eine starke Hemmung des Wurzel- und Koleoptilenwachstums der Haferkaryopsen vor allem im Bereich von $R_f = 0,2$ bis $0,6$ und bei $R_f = 0,8$ (siehe Tabelle III, Seite 39).

Die Ergebnisse zeigen, daß am Zustandekommen der Hemmwirkung nicht ein einzelner Hemmstoff, sondern eine ganze Anzahl in

ihrem chromatographischen Verhalten unterschiedliche Substanzen verantwortlich sind.

R_f - Bereich	Hemmwirkung
Start - $R_f = 0,2$	+
$R_f = 0,2 - 0,6$	++
$R_f = 0,6 - 0,8$	+
$R_f = 0,8$	++
$R_f = 0,8 - \text{Front}$	+

Tab. III: Hemmung des Wurzel- und Koleoptilenwachstums von Haferkaryopsen durch Eluate nach DC - Chromatographie der Neutralsubstanzen der Ätherphase pH 7,0 auf Kieselgelplatten (++ = starke Hemmung, + = schwache Hemmung)

2.6. Untersuchungen zur Identifizierung der Hemmsubstanzen des Haferspelzenextraktes

BÖRNER (1955) warf bei der Diskussion der Bodenmüdigkeit und der gegenseitigen Beeinflussung höherer Pflanzen die Frage auf, ob von höheren Pflanzen stammende physiologisch wirksame organische Substanzen an diesen Erscheinungen beteiligt sind, vor allem die beim Getreideanbau in großen Mengen zurückbleibenden Ernterückstände, die durch Abgabe physiologisch aktiver Verbindungen entweder unmittelbar oder über die Mikroorganismenflora des Bodens einen Einfluß ausüben können. Im Rahmen dieser Untersuchungen an Roggen-, Weizen- und Gerstenstroh konnte er nach Ansäuern des Kaltwasserextraktes und Ausschütteln mit Äther phenolische Verbindungen feststellen, die als p - Cumarsäure (p - Hydroxy- zimtsäure) und als p- Hydroxy- benzoessäure identifiziert werden konnten. In einer weiteren Untersuchung konnte BÖRNER (1956) ein weiteres Zimtsäurederivat als Ferulasäure (4- Hydroxy- 3- methoxy - zimtsäure) nachweisen. In seiner zusammenfassenden Arbeit (1956) verwies er außerdem auf Vanillin-

säure (4-Hydroxy-3-methoxy-benzoesäure), kam aber zu dem Schluß, daß die in den Extrakten gefundenen Mengen sowohl an p-Cumarsäure als auch an p-Hydroxy-benzoesäure nicht ausreichen, um den Hemmeffekt der Kaltwasserextrakte zu erklären. HERRMANN (1957) fand bei seinen Untersuchungen an Blättern von Roggen, Weizen, Gerste, Hafer und Mais, daß von den Phenolcarbonsäuren die Ferulasäure die Hauptkomponente darstellt, während p-Cumarsäure und Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-zimtsäure) in geringerer Menge und Kaffeesäure (3,4-dihydroxy-zimtsäure) ebenso wie Protocatechusäure (3,4-dihydroxy-benzoesäure) nur in Spuren auftreten. JAYACHANDRAN-NAIR und SRIDHAR (1975) konnten in Reisspelzen sieben Phenolcarbonsäuren, darunter Kaffeesäure, Ferulasäure, Vanillinsäure, p-Cumarsäure und p-Hydroxybenzoesäure nachweisen und schließen einen Einfluß durch Ausscheiden dieser Verbindungen während der Keimung des Reises auf die rhizosphäre Mikroflora und auf das Keimlingswachstum nicht aus. Die oben als Hemmstoffe diskutierten Phenolcarbonsäuren sind in Abb. 16 dargestellt.

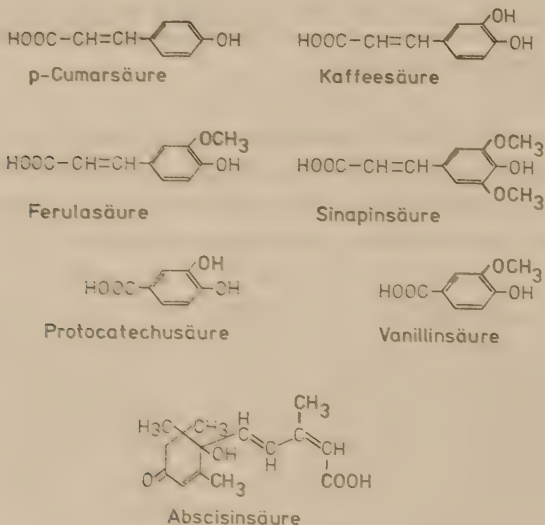


Abb. 16: Strukturformeln der als Keimungshemmstoffe diskutierten Phenolcarbonsäuren und der Abscisinsäure

Abscisisäure (ABA, Strukturformel siehe Abb. 16, Seite 40), ein endogener Hemmstoff des Pflanzenwachstums konnte in einer Reihe von Spezies nachgewiesen werden (MILLBORROW, 1967). Nach ALDICOTT hat diese Substanz eine wichtige Funktion bei der Kontrolle u.a. der Keimruhe und der Keimung. So konnten z.B. WEBB et al. (1973) zeigen, daß während der kalten Stratifikation, die zum Brechen der Keimruhe der Samen von *Acer saccharum* erforderlich ist, der endogene Gehalt an ABA abnimmt.

GOLDBACH und MICHAEL (1976) konnten ABA in Körnern zweier Sorten der Gerste nachweisen. Dabei zeigte die Sorte, die eine sehr kurze Keimruhe und geringe Auswuchsfestigkeit aufweist, einen deutlich geringeren Gehalt an ABA während der Entwicklung des Korns, als die resistendere Sorte, wobei in beiden Fällen eine Abnahme des ABA- Gehaltes mit der Trocknung der Körner einhergeht.

In den nachfolgenden Untersuchungen soll nun geprüft werden, ob und in welchem Maße Phenolcarbonsäuren und ABA an der Keimungshemmung durch den Haferspelzenextrakt beteiligt sind.

2.6.1. Identifizierung der Hemmsubstanzen der Ätherphase pH 1,0 und ihre Prüfung auf keimungshemmende Wirksamkeit

Wie die Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 mittels HPLC- Technik an Reverse - Phase - Gel 33951 / μ C 18 (siehe Seite 77) und die Prüfung der Hemmwirkung der dabei erhaltenen Fraktionen ergab, ist die Hemmwirkung hierbei nicht auf eine einzelne Substanz zurückzuführen, sondern am Zustandekommen der Hemmwirkung sind eine ganze Reihe unterschiedlicher Substanzen beteiligt. Da sie sich bei einem pH- Wert von 1,0 durch Ausschütteln in die Ätherphase überführen lassen, lag die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um organische Säuren handeln könnte, möglicherweise um dieselben, die bereits von BÖRNER und HERRMANN in Getreidestroh bzw. in Getreideblättern identifiziert wurden.

2.6.1.1. Dünnschichtchromatographie der Ätherphase pH 1,0

Zur Prüfung auf bekannte organische Säuren wurden Probemengen der Ätherphase pH 1,0 und authentische Substanzen in verschiedenen Fließmitteln cochromatographiert. Die von JAYACHANDRAN - NAIR und SRIDHAR (1975) zur Auftrennung von Phenolcarbonsäuren aus Reisspelzen verwendeten Fließmittel I = Benzol : Dioxan : Äthylacetat = 90 : 25 : 4 und II = Benzol : Äthylacetat = 3 : 1 auf Kieselgel- Dünnschichtplatten erwiesen sich als nicht brauchbar, da bei Fließmittel I nur geringe R_F - Werte erreicht wurden und die authentischen Substanzen nahezu alle gleiche R_F - Werte hatten, während bei Fließmittel II die Substanzen praktisch an den Startpunkten sitzenblieben. Mit Fließmittel III = Benzol : Dioxan : Essigsäure = 95 : 25 : 4 konnte eine bessere Auftrennung erreicht werden. Vergleichbare Ergebnisse lieferte das Fließmittel Benzol : Methanol : Essigsäure = 120 : 15 : 6 bzw. 90 : 16 : 8. Die bei diesen Fließmitteln erzielte bessere Trennung ist auf die polare Wirkung der Essigsäure zurückzuführen. Die Substanzflecken wurden unter UV - Licht lokalisiert, daneben wurden als Sprühmittel zur Sichtbarmachung diazotierte Sulfanilsäure (nach STAHL) und Anisaldehyd- Schwefelsäure (nach STAHL) verwendet. Bei beiden Nachweisreagenzien handelt es sich um weitgehend unspezifische Sprühreagenzien.

In Abb. 17 (siehe Seite 43) ist das Dünnschichtchromatogramm der Ätherphase pH 1,0 und der authentischen Vergleichssubstanzen dargestellt.

Bei der Chromatographie der Ätherphase pH 1,0 auf Kieselgelplatten wurden ca. 10 Flecke erhalten. Die Hauptkomponente ist auf Grund des R_F - Wertes und der rot- violetten Färbung mit Anisaldehyd- Schwefelsäure der p- Cumarsäure zuzuordnen. Eine eindeutige Aussage über die übrigen Substanzen kann nicht gemacht werden, da sie sich in den R_F - Werten zu wenig voneinander unterscheiden, so daß zu ihrer einwandfreien Identifizierung andere Methoden herangezogen werden müssen. Auf Grund der identischen R_F - Werte einiger Flecken mit Flecken der authentischen Vergleichssubstanzen ist jedoch eine wahrscheinliche Zu-

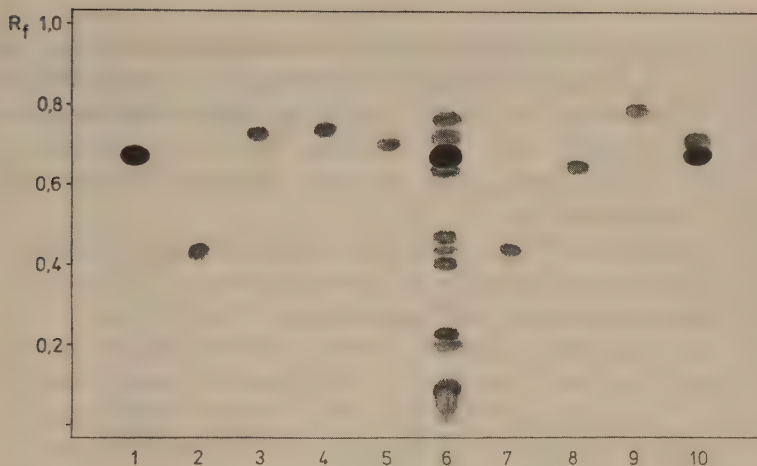


Abb. 17: Dünnschichtchromatogramm der Ätherphase pH 1,0 und authentischer Substanzen (Fließmittel = Benzol : Methanol : Essigsäure = 90 : 16 : 8)

- | | |
|-------------------|---|
| 1 = p- Cumarsäure | 6 = Ätherphase pH 1,0 |
| 2 = Kaffeesäure | 7 = Protocatechusäure |
| 3 = Sinapinsäure | 8 = p- Hydroxy- benzoessäure |
| 4 = Ferulasäure | 9 = Vanllinsäure |
| 5 = Abscisinsäure | 10 = Fraktion VI der Auftrennung
der Ätherphase pH 1,0 an
Reverse- Phase- Gel |

ordnung möglich. Danach scheinen auch Ferula-, p- Hydroxybenzoe- und Vanillinsäure in nennenswerten Mengen vorzukommen. Abscisinsäure scheint als Keimungshemmstoff aus Haferspелzen keine Rolle zu spielen, da sie beim Ansprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure eine grünliche Farbe zeigt, eine solche Färbung im Chromatogramm der Ätherphase pH 1,0 jedoch nicht zu beobachten ist.

Daneben sind aber auf dem Chromatogramm noch weitere Substanzflecken zu finden, deren R_f - Werte nicht mit den als Vergleichssubstanzen aufgetragenen Phenolcarbonsäuren übereinstimmen. Aus der Abbildung 17 ist zu entnehmen, daß sowohl Kaffeesäure

als auch die Protocatechusäure unter diesen Bedingungen identische R_f - Werte zeigen und damit eine Aussage, ob nur eine von beiden Säuren oder aber beide nebeneinander in der Ätherphase pH 1,0 vorliegen, nicht möglich ist. Aus der Farbsintensität ist aber zu schließen, daß nur wenig Substanz mit diesem R_f - Wert vorhanden ist.

Die Fraktion VI der Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 mittels Hochdruckflüssigchromatographie an Reverse- Phase- Gel verursacht die stärkste Hemmung des Wachstums der Wurzeln von Keimlingen von *Amaranthus caudatus* (vergl. Seite 31). Diese Fraktion ergab nach der Entwicklung des Chromatogrammes zwei Flecke, wobei der größere Fleck denselben R_f - Wert hatte, wie die p- Cumarsäure und auch beim Ansprühen mit Nachweisreagenzien dieselbe Farbreaktion ergab wie diese, d.h. daß die Hauptkomponente dieser Fraktion VI p- Cumarsäure darstellt. Nicht identifiziert werden konnte dagegen die zweite in dieser Fraktion enthaltene Substanz, die sich durch einen etwas höheren R_f - Wert auszeichnete als die Hauptkomponente der Fraktion VI. Bei längerem Stehenlassen der entwickelten und nicht besprühten Dünnschichtplatten an der Luft zeigten die Phenolcarbonsäuren eine allmähliche Braunfärbung. Dieselbe Erscheinung wurde aber auch bei den Substanzflecken der Ätherphase pH 1,0 beobachtet, was darauf hindeutet, daß es sich wahrscheinlich auch hier um Phenolcarbonsäuren handelt.

2.6.1.2. Prüfung von Phenolcarbonsäuren und Abscisinsäure auf ihre keimungshemmende Wirksamkeit

Da die Vermutung nahe lag, daß an der Hemmwirkung der Ätherphase pH 1,0 Phenolcarbonsäuren beteiligt sind, war eine Möglichkeit gegeben, sie auf photometrischem Wege durch Messung ihrer UV- Absorption annähernd quantitativ zu erfassen. Diese Substanzen zeichnen sich durch eine starke UV- Absorption je nach Substanz bei einer Wellenlänge von 270 bis 310 nm aus. Dieselben Absorptionsmaxima zeigte aber auch die Ätherphase pH 1,0 (siehe Abb. 18, Seite 45), wobei das Absorptionsmaxi-

mum bei 280 nm lag und eine Schulter bei 310 nm zeigte. Die Abscisinsäure hat ihr Absorptionsmaximum bei 254 nm (jeweils in wässriger Lösung).

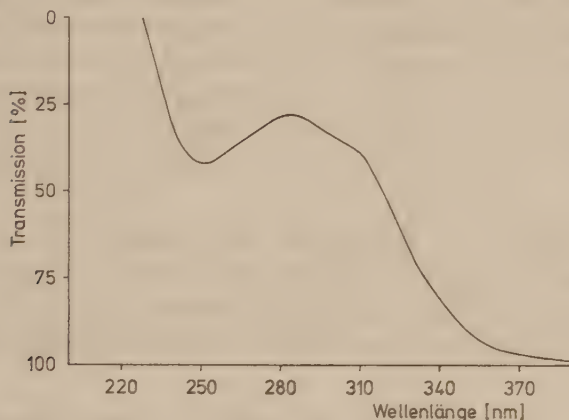


Abb. 18: UV- Absorptionsspektrum der Ätherphase pH 1,0
(in wässriger Lösung)

Für die Ätherphase pH 1,0 (nach Ultrazentrifugation, um absorbierende unlösliche Partikel zu sedimentieren) konnte bei der einfachen Konzentration (bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes) eine Extinktion in wässriger Lösung von 1,75 bestimmt werden (Bezugspunkt: Wellenlänge $\lambda = 280$ nm). Parallel dazu wurden durch Einwiegen von Vergleichssubstanzen (ca. 2 mg/10 ml und anschließender Verdünnung um Faktor 10) die Extinktionswerte der Vergleichssubstanzen bestimmt. Hierbei wurden Extinktionswerte erhalten, die in etwa dem der Ätherphase pH 1,0 entsprachen (vergl. Tabelle IV, Seite 46). Mit der 10-fach konzentrierten Ätherphase pH 1,0 und den unverdünnten Lösungen der Vergleichssubstanzen wurde der Biotest mit Samen von *Amaranthus caudatus* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV dargestellt.

Substanz	Extinktion	% Hemmung	
		10- fach konz.	nicht konz.
H ₂ O (Kontrolle)		0,0	0,0
Ätherphase pH 1,0	1,75	100,0	32,4
Abscisinsäure	0,70	100,0	100,0
Kaffeesäure	1,80	55,6	10,5
Ferulasäure	1,50	88,3	15,9
p- Cumarsäure	1,85	88,9	19,0
Sinapinsäure	0,80	11,1	(12,7)

Tab. IV: Darstellung der Hemmung des Wurzelwachstums von *Amaranthus caudatus*- Keimlingen durch die Ätherphase pH 1,0 und Vergleichssubstanzen (Konzentration bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes)

Aus Tabelle IV ist zu ersehen, daß keine der getesteten Substanzen die Hemmwirkung der Ätherphase pH 1,0 erreicht, mit Ausnahme von Abscisinsäure. Diese zeigt selbst in der nicht konzentrierten Lösung eine Hemmwirkung von 100 %. Daß aber Abscisinsäure nicht am Zustandekommen der Hemmwirkung beteiligt ist, ergab sich aus Versuchen, bei denen ABA zusammen mit der Ätherphase pH 1,0 auf Reverse- Phase- Gel 33951 / μ C 18 chromatographiert wurde (siehe Abb. 11, Seite 30). Hierbei wurde ABA bei einer Retentionszeit eluiert, bei der bereits sämtliche Substanzen der Ätherphase pH 1,0 von der Säule eluiert waren. Außerdem zeigte ABA beim Ansprühen der Dünnschichtplatten mit Anisaldehyd- Schwefelsäure eine andere Färbung als die Substanzen der Ätherphase pH 1,0 im gleichen R_f - Bereich.

2.6.2. Quantitative Bestimmung der in der Ätherphase pH 1,0 enthaltenen Phenolcarbonsäuren mittels Gaschromatographie

Um quantitative Bestimmungen der Phenolcarbonsäuren der Ätherphase pH 1,0 als auch von Vergleichssubstanzen gaschromatographisch durchführen zu können, war es erforderlich, definierte

Mengen der Ätherphase pH 1,0 und der Vergleichssubstanzen zu derivatisieren, um deren Flüchtigkeit zu erhöhen. Dies erfolgte durch Methylierung mit Diazomethan (siehe Seite 70). Als Grundlage der quantitativen Bestimmungen dienten die Mittelwerte der Flächenintegrale der durch mehrmaliges Einspritzen erhaltenen Peaks. In Abbildung 19 ist das Gaschromatogramm der Ätherphase pH 1,0 dargestellt.

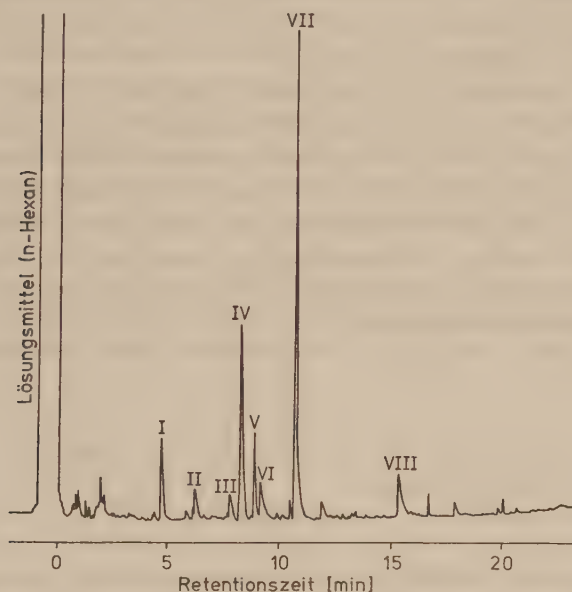


Abb. 19: Gaschromatogramm der Ätherphase pH 1,0

Einspritzung: 1 μ l

Säule: SF 96 (50 m)

Trägergas: Wasserstoff (0,6 atü)

Injektor: 225°C

Temperaturprogramm: 5°C / min (100°C - 220°C)

Peak I: p- Hydroxy- benzoessäure

Peaks II - V: nicht identifiziert

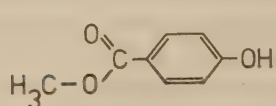
Peak VI: Vanillinsäure

Peak VII: p- Cumarsäure

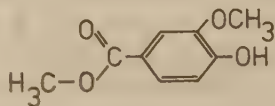
Peak VIII: Ferulasäure

Hierbei konnte Peak I durch Einspritzen von Vergleichssubstanz als p- Hydroxy- benzoesäure- methylester identifiziert werden. Bei Peak VI handelt es sich entweder um Vanillinsäure- oder Protocatechusäure- methylester, da diese bei derselben Retentionszeit erscheinen, auch dann, wenn das Temperaturprogramm mit nur 1°C / min abgefahren wird. Aus der Dünnschichtchromatographie der Ätherphase pH 1,0 (siehe Abb. 17, Seite 43) ist aber zu entnehmen, daß Protocatechusäure nur in geringen Spuren vorliegt, so daß es sich bei Peak VI in überwiegendem Maße um Vanillinsäure handeln sollte.

Relativ stark ausgeprägt sind die Peaks der Methylester der Substanzen IV und V, deren Identität bislang noch nicht ermittelt werden konnte. Aus ihrem gaschromatographischen Verhalten ist aber abzuleiten, daß es sich hierbei wahrscheinlich ebenfalls um Phenolcarbonsäuren handelt, die dann in ihren chemischen Strukturen eine Zwischenstellung zwischen den Methylestern der p- Hydroxy- benzoesäure und der Vanillinsäure (siehe Abb. 20) einnehmen sollten.



p- Hydroxy- benzo-
säuremethylester



Vanillinsäure-
methylester

Abb. 20: Strukturformeln der Methylester der p- Hydroxy-
benzoe- und der Vanillinsäure

Peak VII konnte als p- Cumarsäure- methylester identifiziert werden und stellt somit die Hauptkomponente der Methylester der Ätherphase pH 1,0 dar. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie der Ätherphase pH 1,0 überein. Bei Peak VIII könnte es sich sowohl um Kaffeesäure-

als auch um Ferulasäure- methylester handeln, da diese unter den gegebenen Bedingungen gleiche Retentionszeiten zeigen. Aber auch hier konnte bei der Dünnschichtchromatographie der Ätherphase pH 1,0 Kaffeesäure nur in Spuren festgestellt werden (Protocatechusäure lieferte denselben R_f - Wert), so daß anzunehmen ist, daß Peak VIII in überwiegendem Maße Ferulasäure- methylester darstellt. Dieselbe Reihenfolge des Auftretens der Methylester ermittelte MORITA (1972) bei der gaschromatographischen Trennung der silylierten Phenolcarbonsäuren. Danach erscheint Syringasäure- methylester zwischen Vanillinsäure- und p- Cumarsäure- methylester. Im Gaschromatogramm der Ätherphase pH 1,0 ist aber in diesem Bereich kein nennenswerter Peak zu finden, so daß Syringasäure als Hemmstoffkomponente ausscheidet. Genauso Sinapinsäure, deren Methylester erst bei einer höheren Retentionszeit als der des Ferulasäure- methylesters erscheint.

In der Tab. V sind die ermittelten Mengenwerte der in der Ätherphase pH 1,0 identifizierten Phenolcarbonsäuren dargestellt (die gefundenen Werte beziehen sich auf einen durch Hitzeextraktion von 60 g Haferspelzen / 500 ml Wasser erhaltenen Extrakt = 395 ml).

Substanz	gefundene Menge in mg	Molarität der Lösung
p- Hydroxy- benzoesäure	0,829	$1,52 \times 10^{-5}$
Vanillinsäure	0,724	$1,09 \times 10^{-5}$
p- Cumarsäure	4,647	$7,16 \times 10^{-5}$
Ferulasäure	1,321	$1,72 \times 10^{-5}$

Tab. V: Darstellung der bei der quantitativen Gaschromatographie der Ätherphase pH 1,0 gefundenen Mengen an Phenolcarbonsäuren (durch Hitzeextraktion erhaltener Extrakt von 60 g Haferspelzen / 500 ml H_2O = 395 ml)

Um die Wirksamkeit der in der Ätherphase pH 1,0 ermittelten Mengen an Phenolcarbonsäuren in Bezug auf die Keimungshemmung zu testen, wurden die vier identifizierten Säuren in dem analytisch ermittelten Konzentrationsverhältnis gelöst (vergl. Tab. V) und in der 10- fachen Konzentration (bezogen auf die gefundenen Werte im Extrakt von 395 ml) im Biotest mit Haferkaryopsen überprüft. Hierbei zeigte es sich, daß die Keimwurzeln praktisch dieselben Längenwerte aufwiesen, wie die Wurzeln der parallel dazu angesetzten Wasserkontrolle. Dagegen zeigt aber eine 10- fach konzentrierte Ätherphase pH 1,0 (bezogen auf das Volumen des Spelzenextraktes) eine Hemmung des Wurzelwachstums von über 90 % (siehe Tab. 13, Seite 92), d.h. aber, daß die in der Ätherphase pH 1,0 bisher identifizierten Phenolcarbonsäuren für sich allein keine Hemmwirkung auslösen können. Welche Bedeutung in der Hemmwirkung den im Gaschromatogramm der Ätherphase pH 1,0 noch nicht identifizierten Substanzen zukommt oder ob eine additive Wirkung mit den bereits identifizierten Verbindungen besteht, kann nach den bislang durchgeführten Versuchen nicht gesagt werden. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, daß die in der Ätherphase pH 1,0 für die Keimungshemmung verantwortlichen Substanzen durch Diazomethan nicht methyliert werden und somit im Gaschromatogramm überhaupt nicht erscheinen.

Aus Tabelle IV (siehe Seite 46) ist zu entnehmen, daß gleiche Konzentrationen an Kaffee-, Ferula- und p- Cumarsäure bei Samen von *Amaranthus caudatus* in etwa die gleiche Hemmwirkung hervorrufen. Nun liegen aber die durch Gaschromatographie ermittelten Molaritäten der identifizierten Phenolcarbonsäuren einer nicht konzentrierten Ätherphase pH 1,0 im Bereich von 10^{-5} m (siehe Tab. V, Seite 49). In einer Biotestreihe mit p- Cumarsäure konnte aber gezeigt werden, daß Konzentrationen, deren Molarität geringer als 10^{-5} m ist, auf das Wachstum der Primärwurzeln von Samen von *Avena sativa* im Keimtest keinen Einfluß ausüben (siehe Abb. 21, Seite 51).

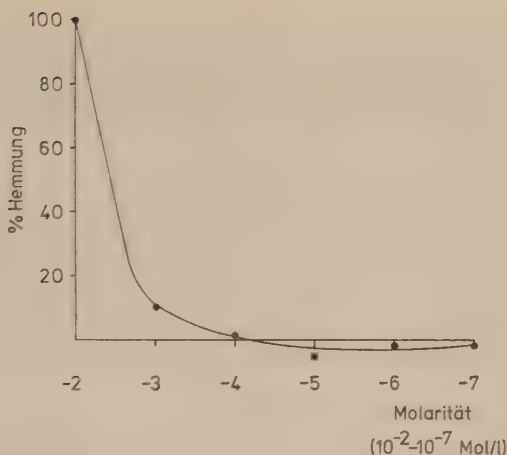


Abb. 21: Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln bei der Keimung von Haferkaryopsen durch p- Cumarsäure- Lösungen unterschiedlicher Molaritäten

Aus den ermittelten Molaritäten der Phenolcarbonsäuren der Ätherphase pH 1,0 wird aber verständlich, daß selbst eine 10-fache Konzentrierung keine Wirkung auf die Keimung haben kann.

Eine durch die Säuregruppen der Phenolcarbonsäuren hervorgerufene Erniedrigung des pH- Wertes der Lösung kann in unseren Versuchen nicht die Ursache für eine Hemmung der Keimung sein. Das zeigt der nahezu neutrale pH- Wert des Spelzenextraktes (pH 6,2 bis 7,2, je nach pH- Wert des zur Extraktion der Spelzen verwendeten dest. Wassers). Ferner bewirkten stark verdünnte wässrige Schwefelsäurelösungen bzw. NaHCO_3 - Lösung im pH-Bereich von pH 3,0 bis pH 8,0 keine Beeinträchtigung des Wurzelwachstums bei der Keimung von Haferkaryopsen gegenüber den Wasserkontrollen (pH 7,0). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von WINTER und SCHÖNBECK (1953) an Extrakten von Getreidestroh und NIEMANN (1952), der Hemmwirkung des Kresswurzelwachstums erst bei pH- Werten kleiner als 2,4 und höher als 8,5 feststellte.

2.7. Prüfung des Haferspелzenextraktes auf keimungshemmende Substanzen, die nicht mit Äther ausschüttelbar sind

NIEMANN (1952) zeigte an einer Reihe von Samenextrakten, daß stark hemmende Extrakte oft auch starke Aminosäurereaktionen geben, nicht hemmende bzw. schwach hemmende Extrakte dagegen keine oder nur sehr geringe Reaktion geben (Nachweis mit Ninhydrin). Nach seinen Untersuchungen könnten die Aminosäuren durchaus neben anderen Substanzen an der Hemmwirkung der Extrakte beteiligt sein.

Auch GRIMM (1952) hielt es für möglich, daß bei genuinen Ausscheidungen aus Samen von *Digitalis purpurea* L. Aminosäuren in den Extrakten einen gewissen Hemmungsanteil hervorrufen können.

JRESSEL und HOLM (1964) führten die keimungshemmende Wirkung der Extrakte von *Abutilon theophrasti* auf das Freiwerden von Aminosäuren aus den Samen zurück.

Eine positive Ninhydrinreaktion war auch beim Haferspелzenextrakt feststellbar. Um eine eventuelle Beteiligung von Aminosäuren an der keimungshemmenden Wirkung des Haferspелzenextraktes festzustellen, wurde ein 4-fach konzentrierter Spелzenextrakt (nach Gefriertrocknung in entsprechendem Volumen dest. Wasser aufgenommen) einer quantitativen Aminosäureanalyse (siehe Seite 79) unterzogen. In einem Fall wurde die Probe nicht hydrolysiert. Hierbei werden nur die freien Aminosäuren erfaßt. Daneben wurde eine weitere Probe mit HCl hydrolysiert, wobei auch die in der Lösung enthaltenen Aminosäuren von Peptiden nach deren Hydrolyse erfaßt werden. In Tabelle VI (siehe Seite 55) sind die gefundenen Mengenwerte der dabei identifizierten Aminosäuren sowohl der hydrolysierten als auch der nicht hydrolysierten Probe dargestellt.

Daneben wurden noch drei weitere nicht proteinogene Aminosäuren gefunden, deren Identität nicht bestimmt werden konnte, die aber nur in sehr geringen Mengen vorliegen.

Aminosäure	hydrolysiert uM / ml	nicht hydrolysiert uM / ml
Lysin	0,23790	0,07403
Histidin	0,07105	0,01338
Arginin	0,19398	0,08439
Asparaginsre.	1,00143	0,12958
Threonin	0,39550	0,07496
Serin	0,58506	0,27524
Glutaminsre.	1,25439	0,33914
Prolin	0,48172	0,08881
Glycin	0,86593	0,06736
Alanin	0,73379	0,21303
Cystein	0,03931	0,07077
Isoleucin	0,23845	0,05451
Leucin	0,37731	0,11720
Tyrosin	0,15898	0,04739
Phenylalanin	0,18197	0,05520

Tab. VI: Darstellung der Aminosäuremengen (uM / ml) eines
4- fach konzentrierten Spelzenextraktes

Zur Prüfung der Wirksamkeit der gefundenen Aminosäuremengen auf die Keimung wurden Lösungen, die alle vorstehend aufgeführten Aminosäuren in den entsprechenden Molaritäten enthielten, angesetzt und damit der Keimtest mit Haferkaryopsen durchgeführt. Dabei wurden für beide Lösungen (die den Werten der hydrolysierten, als auch der nicht hydrolysierten Probe entsprachen) die gleichen Wurzellängen erhalten wie bei den Wasserkontrollen, d.h. daß die Aminosäuremengen, die in einem 4-fach konzentrierten Extrakt enthalten sind, keinen Einfluß auf die Keimung haben. Die gleichen Mengen an Aminosäuren der nicht hydrolysierten Probe sollten jedoch auch in der nach dem Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration des Spelzenextraktes bei verschiedenen pH- Werten zurückbleibenden wässrigen Phase enthalten sein (siehe Seite 75). Hierbei ist aber eine

deutliche Hemmung des Wurzelwachstums festzustellen, die deshalb auf andere Substanzen zurückgeführt werden muß.

Daneben zeigte NIEMANN, daß im allgemeinen stark hemmende Extrakte eine starke Eisen- III- chloridfällung ergeben. Er glaubt zumindest in manchen Fällen die darin enthaltenen Gerbstoffe für die Keimungshemmung verantwortlich machen zu können. Auch zeigen fast alle stark hemmenden Extrakte eine mehr oder minder starke Eigenfärbung, schwach hemmende Extrakte eine geringe bzw. keine Färbung.

Für den ebenfalls bräunlich gefärbten Haferspelzenextrakt gab es keine Hinweise, daß möglicherweise darin enthaltene Gerbstoffe für die Keimungshemmung mitverantwortlich sein könnten, da sämtliche auf Gerbstoffe ansprechenden Nachweisreaktionen negativ ausfielen. Als Nachweisreagenzien wurden hierbei benutzt: Eisen- III- chloridlösung (ergibt bei Anwesenheit von Gerbstoffen schwarzen Niederschlag), ammoniakalische Silber- salzlösung (Schwarzfärbung bis Silberspiegel) und Ammoniummolybdat in konzentrierter wässriger Ammoniumchloridlösung (gelbe Niederschläge). Da sämtliche getesteten Nachweisreagenzien keine Fällungsreaktionen ergaben, können Gerbstoffe an einer Beteiligung bei der Keimungshemmung der Haferkaryopsen ausgeschlossen werden.

2.8. Antagonismus von keimungshemmenden Substanzen aus Hafer- spelzen und Indolyl- 3- essigsäure

ELLIOTT und LEOPOLD (1952) zeigten, daß ein wässriger Extrakt aus Spelzen von *Avena sativa* in der Lage ist, einen durch Indolyl- 3- essigsäure (IES), einem in Pflanzen vorkommenden Hormon der Zellstreckung, hervorgerufenen und von der jeweiligen IES- Konzentration abhängigen Längenzuwachs bei Segmenten von etiolierten Erbsenkeimlingen (Hypokotyl) zu vermindern.

Dieser Antagonismus scheint auch in umgekehrter Richtung zu gelten. Man beobachtet ihn an einem intakten System, in unserem

Fall der Karyopsen von *Avena sativa*.

Zunächst wurden die Karyopsen in IES- Lösungen definierter Molaritäten gekeimt. Wie die Abbildung 22 zeigt, wird das Wachstum der Primärwurzeln der Haferkaryopsen durch IES im Konzentrationsbereich von 10^{-3} m bis etwa 10^{-8} m gehemmt, wobei die Hemmung des Wachstums mit abnehmender Konzentration immer geringer wird. Für die Koleoptilen (siehe Abb. 23, Seite 56) wird eine Hemmung des Wachstums im Konzentrationsbereich von 10^{-3} m bis 10^{-7} m beobachtet. Geringere Konzentrationen haben keinen meßbaren Einfluß mehr.

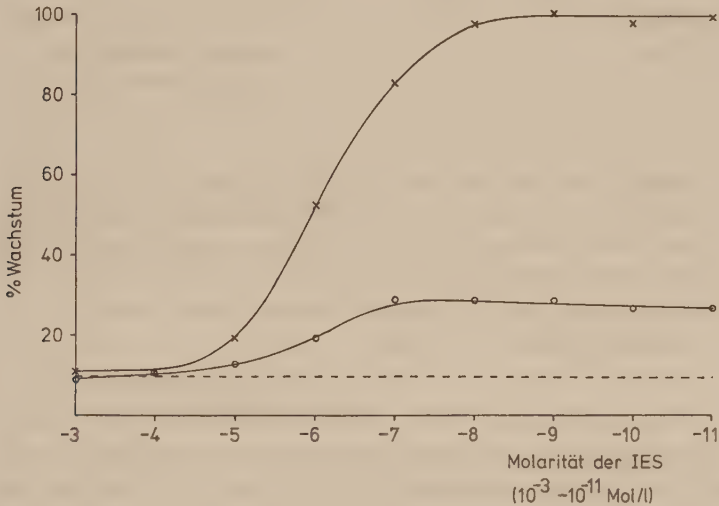


Abb. 22: Darstellung des prozentualen Wachstums der Primärwurzeln von Haferkaryopsen bei der Keimung in IES- Lösungen verschiedener Konzentrationen x—x, bzw. IES- Lösungen, die 5- fach konz. Spelzenextrakt enthalten o—o und 5- fach konz. Haferspelzenextrakt — — — —, Wasserkontrolle = 100 %.

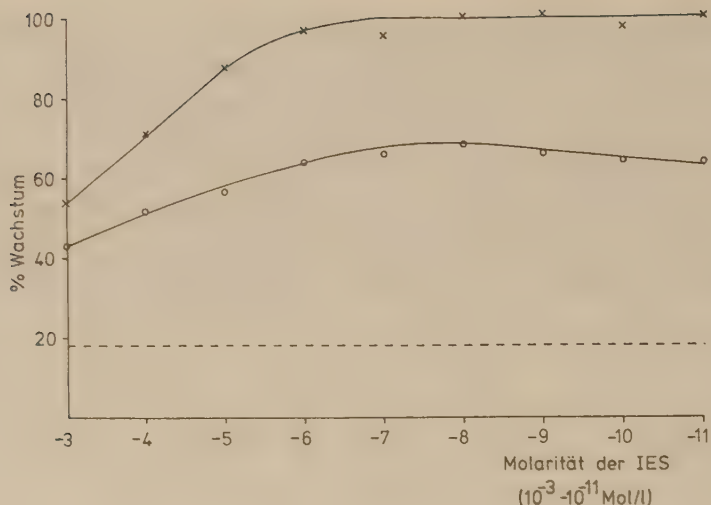


Abb. 23: Darstellung des prozentualen Wachstums der Koleoptilen von Haferkaryopsen bei der Keimung in IES-Lösungen verschiedener Konzentrationen x—x, bzw. IES-Lösungen, die 5-fach konz. Spelzenextrakt enthalten o—o und 5-fach konz. Haferspelzenextrakt — — —, Wasserkontrolle = 100 %.

Ein 5-fach konzentrierter Spelzenextrakt (bezogen auf das Volumen des Spelzenrohextraktes, Hitzeextraktion) bewirkt ein Längenwachstum der Primärwurzeln von nur ca. 10 % und der Koleoptilen von 18 % (Wasserkontrollen = 100 %, siehe auch Tabelle 8, Seite 90).

In den Abbildungen 22 und 23 sind auch die prozentualen Wachstumskurven der Primärwurzeln und der Koleoptilen dargestellt, die erhalten werden, wenn Haferkaryopsen in Lösungen gekeimt werden, die Spelzenextrakt in 5-facher Konzentration und IES in Molaritäten von 10⁻³ m bis 10⁻¹¹ m enthalten.

Bei einem 5-fach konzentrierten Haferspelzenextrakt, der IES in unterschiedlichen Konzentrationen enthält, zeigt sich, daß der das Wachstum der Primärwurzeln der Haferkaryopsen stark

hemmende Effekt des Extraktes (ca. 10 % Wachstum) deutlich vermindert wird. Hierbei werden bei einer Konzentration von 10^{-8} m IES Wachstumswerte der Wurzellängen von ca. 29 % erreicht (siehe Abb. 22, Seite 55, Wasserkontrolle = 100 %). Bei geringeren Molaritäten an IES sinken die prozentualen Wurzellängenwerte wieder langsam ab, d.h., daß hier der antagonistische Effekt der IES auf Grund der immer stärkeren Verdünnung wieder aufgehoben wird.

Im wesentlichen wird dieselbe Beobachtung beim Längenwachstum der Haferkoleoptilen gemacht, wenn der Spelzenextrakt IES in unterschiedlichen Molaritäten enthält. 5- fach konzentrierter Haferspelzenextrakt bewirkt ein Längenwachstum der Koleoptilen von nur 18 %. Enthält dieser aber IES in einer Molarität von 10^{-8} m, so werden Längenwerte für die Koleoptilen von ca. 69 % erreicht (siehe Abb. 23, Seite 56). Hierbei wird also die hemmende Wirkung noch stärker reduziert als beim Wachstum der Primärwurzeln der Haferkaryopsen. Ferner ist auch hier wieder ein langsames Abnehmen des prozentualen Längenwachstums der Koleoptilen mit abnehmender Konzentration an IES (geringer als 10^{-8} m) feststellbar (Verdünnungseffekt).

2.9. Diskussion der Ergebnisse

ELLIOTT und LEOPOLD (1952) wiesen einen Keimungshemmstoff in Samen von *Avena sativa* L. nach. Ihren Untersuchungen zufolge sollte es sich um eine wasserlösliche, hitzestabile, nicht dialysierbare und durch konzentrierte Ammoniumsulfat- Lösung nicht fällbare Substanz handeln. Sie folgerten daraus, daß es sich bei dieser Substanz um ein relativ hochmolekulares Polypeptid handeln könnte. Ferner konnten sie diese Substanz in überwiegendem Maße in den die Karyopsen umhüllenden Spelzen nachweisen.

In eigenen Untersuchungen wurden keimungshemmende Extrakte aus Spelzen von *Avena sativa* L. unterschiedlicher Herkunft erhalten. Bei der Wahl der Extraktionsbedingungen wurde der Hitze-

extraktion der Vorzug gegeben. Bei der wässrigen Extraktion der Haferspелzen bei 27°C konnte mikroskopisch im Extrakt ein relativ starkes Bakterienwachstum festgestellt werden. Da aber nach GRIMM (1953) bei Raumtemperatur eine Inaktivierung vegetabilischer Hemmstoffe durch bakterielle Tätigkeit eintritt, wurde von dieser Extraktionsmethode Abstand genommen. Zu entsprechenden Ergebnissen kam NIEMANN (1952) bei seinen Untersuchungen an Samen von *Foeniculum vulgare* MILLER und sieben weiteren genuinen Extrakten. Von einem Zusatz von bakterienwachstumshemmenden Substanzen zum Extraktionsmedium war abzusehen, da diese in Konzentrationen, die zu einer nahezu vollständigen Hemmung des Bakterienwachstums führen, die Keimung der Haferkaryopsen sehr stark beeinflussen, so daß bei gleichzeitigem Vorliegen von Keimungshemmstoffen und zugesetzten Substanzen, die das Bakterienwachstum beeinträchtigen, keine Aussagen über die Wirkung der Keimungshemmstoffe mehr möglich sind.

Extrakte, die bei 4°C gewonnen wurden, führten gegenüber Extrakten, die durch Hitzeextraktion erhalten wurden, zu größeren Längen der Primärwurzeln bzw. Koleoptilen der Haferkaryopsen als bei Hitzeextraktion, was auf der größeren Ausbeute an Hemmstoffen bei der Hitzeextraktion beruhen dürfte. Nach ELLIOTT und LEOPOLD stellt der Keimungshemmstoff aus den Haferspелzen eine hitzestabile Substanz dar. In unseren Versuchen konnte auch nach einstündigem Kochen der Spelzen Hemmwirkung nachgewiesen werden. WINTER und SCHÖNBECK (1953) zeigten, daß die hemmende Wirkung von Weizenstrohextrakt durch 2 1/2 stündiges Erhitzen bei 95°C nicht vermindert wurde. Auf Grund der höheren Ausbeuten wurde bei vielen Versuchen für die Extraktgewinnung die Hitzeextraktion angewendet.

Der Haferspелzenextrakt ist in der Lage, die Keimung zahlreicher Samen sowohl monokotyler als auch dikotyler Pflanzen zu beeinflussen, d.h., daß es sich hierbei nicht um artspezifische Substanzen handelt, die nur in der Lage sind, die Keimung der eigenen Art zu hemmen. Nach KETRING (1973) sind Keimungshemmstoffe meist nicht artspezifisch, so daß ein Hemmstoff die Keimung verschiedener Arten beeinträchtigen kann. Aller-

dings ist die Empfindlichkeit verschiedener Samen gegenüber der gleichen Konzentration an Hemmstoff sehr variabel.

KATO et al. (1977) konnten aus 300 kg Reisspelzen ca. 1,1 g Momilacton- A und 400 mg Momilacton- B isolieren, daneben 10 mg Ineketon, 13 mg S(+)- dehydrovomifoliol und ca. 2- 3 mg Momilacton- C, die nach ihrer Ansicht eine Rolle bei der Keimungshemmung einer schlecht keimenden Reissorte spielen. Wenn die Autoren für Momilacton- A bzw. Momilacton- B 1000 ppm einsetzen, erhalten sie dabei Keimraten von ca. 65 % bzw. 7 % (Testsaatgut: Lactuca). Bei Einsatz von 1000 ppm Ineketon werden Keimraten von 55 % und bei S(+)- dehydrovomifoliol 30 % erreicht, d.h. aber, daß die Autoren mit den von ihnen aus 300 kg Reisspelzen isolierten Substanzen nur geringe Volumina an keimungshemmenden Lösungen ansetzen können. Daraus ist aber zu entnehmen, daß es äußerst fragwürdig ist, ob diese Substanzen unter natürlichen Bedingungen überhaupt eine Rolle bei der Keimungshemmung des Reises spielen. Aus diesem Grunde war es notwendig, alle bei der Anreicherung der Keimungshemmstoffe aus Haferspelzen durchgeführten Arbeitsschritte mit Hilfe eines quantitativen Biotestes zu überprüfen.

Für quantitative Untersuchungen der Keimungshemmung durch Haferspelzenextrakt war es erforderlich, einen genügend aussagekräftigen Biotest auszuarbeiten. Zahlreiche Autoren benutzen hierzu die Angabe der Keimungshemmung in Keimprozenten. Dies war in unserem Fall nicht möglich, da außer bei Konzentrationen, bei denen die Keimung der Karyopsen nahezu vollständig unterdrückt wurde, die Keimprozente immer über 90 % lagen. Aus diesem Grunde dienten bei quantitativen Bestimmungen die Längen der Primärwurzeln bzw. der Koleoptilen bei Haferkaryopsen bzw. die Wurzellängen bei Keimlingen von *Amaranthus caudatus*. Bei Untersuchungen, bei denen nur geringe Volumina an keimungshemmenden Lösungen zur Verfügung standen, wurden Samen von *Amaranthus caudatus* verwendet, die sich hierfür als gut geeignet erwiesen. Die Keimung erfolgte sowohl in den Wasserkontrollen als auch in den hemmstoffhaltigen Lösungen gleichzeitig, allerdings führten hemmstoffhaltige Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration an Hemmstoff gegenüber den Wasserkontrollen zu

deutlich vermindertem Wachstum der Primärwurzeln bzw. der Koeoptilen (bei *Avena sativa*). Dies heißt aber nicht, daß nicht schon vor der äußerlich sichtbaren Keimung bereits Prozesse ablaufen, die durch hemmstoffhaltige Lösungen beeinflusst werden können.

Dialyseversuche zeigten, daß nach einer Dialysezeit von 72 Stunden von den ursprünglich im Haferspelzenextrakt vorhandenen 55 % an Hemmaktivität nur noch 9 % erhalten bleiben. In dieser Zeit sind also nahezu die gesamten in der Lösung enthaltenen Keimungshemmstoffe in das Außenmedium diffundiert. Eine Inaktivierung der Hemmstoffe während der Dialysezeit konnte durch Kontrollversuche, bei denen der Haferspelzenextrakt über die gleiche Zeit und bei derselben Temperatur aufbewahrt wurde, ausgeschlossen werden. Auf Grund der Versuchsergebnisse ist anzunehmen, daß es sich bei den Keimungshemmstoffen zumindest überwiegend um relativ niedermolekulare Substanzen handelt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu ELLIOTT und LEOPOLD (1952), nach deren Untersuchungen es sich bei der keimungshemmenden Substanz aus Spelzen von *Avena sativa* um eine nicht dialysierbare, relativ hochmolekulare Substanz handeln soll. Nach KETRING (1973) aber stellen die meisten natürlichen Keimungshemmstoffe relativ einfache organische Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht dar. Außerdem ist es ziemlich unwahrscheinlich, daß eine Substanz aus Haferspelzen mit relativ hohem Molekulargewicht durch die Zellwände der Haferkaryopsen bzw. die Zellwände des Embryos aufgenommen wird (Transportproblem), um dann im Zellinneren seine physiologische Wirkung zu entfalten.

Ein weiterer Hinweis, daß es sich bei den Keimungshemmstoffen um Substanzen mit relativ niedrigem Molekulargewicht handelt, erbrachte die Gelfiltration des Spelzenextraktes an Acrylex-P 2. Hierbei wurde die Hauptaktivität in Fraktion II gefunden. Fraktion II wird aber erst nach dem Ausschlußpeak eluiert, wobei die Ausschlußgrenze für Acrylex-P 2 bei ca. 2000 Daltons liegt.

Nachdem sich zeigte, daß die stärkste Hemmwirkung in Fraktion II der Gelfiltration des Haferspelzenextraktes an Acrylex-P 2

vorlag, wurde diese bei verschiedenen pH- Werten ausgeschüttelt. Hierbei wurde eine starke Hemmwirkung in der Ätherphase pH 1,0 und in der nach dem Ausschütteln mit Äther verbleibenden wässrigen Phase gefunden. Geringe Hemmwirkung lag in der Ätherphase pH 7,0 vor und keine Hemmwirkung wurde beim Ausschütteln des Extraktes bei pH 11,0 bis 12,0 gefunden. Dies deutete darauf hin, daß wahrscheinlich organische Säuren und amphotere Substanzen in erster Linie am Zustandekommen der Keimungshemmung beteiligt sind.

Für die Ermittlung der quantitativen Verteilung der Hemmwirkung auf die bei den verschiedenen Auftrennungsverfahren erhaltenen Fraktionen leisteten die aus den Hemmkurven des Wurzelwachstums der Haferkaryopsen durch eine Lineweaver- Burk- Umformung erhaltenen Geraden gute Dienste. Als willkürlicher Bezugspunkt wurde diejenige Konzentration der jeweiligen Fraktion angenommen, bei der eine Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln der Haferkaryopsen von 20 % erreicht wurde. Diese Methode ist allerdings nur in dem Konzentrationsbereich brauchbar, in dem die Meßpunkte auf einer Geraden liegen, nicht dagegen bei relativ geringen Konzentrationen, da es sich hier zeigte, daß durch die reziproke Umformung der prozentualen Hemmwerte des Wurzelwachstums starke Streuungen auftraten. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, die Hemmwirkung der in den jeweiligen Fraktionen enthaltenen Hemmsubstanzen in Hemmeinheiten auszudrücken.

Hiernach werden im Haferspелzenextrakt (90 g Haferspелzen, 750 ml Wasser, Extrakt ca. 600 ml) 320 Hemmeinheiten gefunden, nach der Gefriertrocknung desselben nur noch 270 Hemmeinheiten. Dieser Verlust ist auf relativ leicht flüchtige Komponenten im Extrakt zurückzuführen, die im angelegten Vakuum verloren gehen. Relativ leicht flüchtige keimungshemmende Komponenten konnten auch durch Wasserdampfdestillation im Haferspелzenextrakt nachgewiesen werden.

In Fraktion I der Gelfiltration des Haferspелzenextraktes an Acrylex- P 2 werden nur 18 Hemmeinheiten gefunden, d.h. aber, daß höhermolekulare Substanzen für die Keimungshemmung nicht verantwortlich zu machen sind (Ausschlußgrenze ca. 2000 Daltons). 245 Hemmeinheiten werden dagegen in Fraktion II ermit-

teilt, keine Hemmeinheiten in Fraktion III. In Fraktion III ist vielmehr nahezu über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich eine leichte Förderung des Wachstums der Primärwurzeln der Haferkaryopsen gegenüber den Wasserkontrollen festzustellen. Möglicherweise ist dies auf das Vorhandensein von wachstumsfördernden Substanzen zurückzuführen. Die Summe von 263 Hemmeinheiten in den Fraktionen I + II bedeutet praktisch einen Wiederfund von 97 % der im Spelzenextrakt nach der Gefrier-trocknung enthaltenen 270 Hemmeinheiten.

Beim Ausschütteln der Fraktion II der Gelrfiltration des Hafer-spelzenextraktes an Acrylex- P 2 werden in der Ätherphase pH 7,0 57 Hemmeinheiten, in der Ätherphase pH 1,0 105 und in der verbleibenden wässrigen Phase 91 Hemmeinheiten gefunden, d.h., daß die Hemmwirkung überwiegend auf organische Säuren und amphotere Substanzen zurückzuführen ist. Das bedeutet aber weiterhin, daß nicht eine einzelne Hemmsubstanz, sondern deren mehrere für die Keimungshemmung verantwortlich sind.

Ein weiterer Hinweis, daß in den Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0 unterschiedliche keimungshemmende Substanzen vorliegen, war durch die hochdruckflüssigchromatographische Auftrennung dieser beiden Fraktionen an Lichrosorb SI 100 gegeben. Hierbei konnte an Hand der Peakflächenverhältnisse und der unterschiedlichen Retentionszeiten gezeigt werden, daß in der Ätherphase pH 1,0 durch das Ausschütteln mit Äther eine andere Komponente angereichert wird, als in der Ätherphase pH 7,0.

Ferner ergab sich aus dünn-schichtchromatographischen Trennversuchen, daß die durch die Ätherphase pH 1,0 hervorgerufene Keimungshemmung nicht auf eine einzelne Komponente zurückzuführen ist, sondern daß mehrere Substanzen am Zustandekommen der Hemmwirkung beteiligt sind. Ein weiterer Hinweis für die Unterschiedlichkeit der Hemmsubstanzen der Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0 konnte durch die Auftrennung der Ätherphase pH 7,0 mittels Hochspannungselektrophorese erhalten werden. Sollte es sich bei den Hemmsubstanzen der Ätherphase pH 1,0 in erster Linie um organische Säuren handeln, die bei diesem pH- Wert in

die Ätherphase überführbar sind, so bleibt der Hauptanteil der Hemmsubstanzen der Ätherphase pH 7,0 während der Entwicklung des Chromatogrammes am Auftragepunkt sitzen, d.h., daß es sich hierbei in überwiegendem Maße um ungeladene Substanzen handelt. Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser neutralen Substanzen der Ätherphase pH 7,0 auf Kieselgel- Dünnschichtplatten führte zu dem Schluß, daß die Hemmwirkung auch hier auf das Vorhandensein mehrerer keimungshemmender Komponenten zurückzuführen ist.

Die Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 mittels Hochdruckflüssigchromatographie an Reverse- Phase- Gel führte zu sieben Fraktionen, die alle eine mehr oder minder starke Beeinflussung des Wachstums der Wurzeln bei Keimlingen von *Amaranthus caudatus* hervorriefen, insbesondere die Fraktion VI, die die stärkste Hemmwirkung verursachte. Hieraus ist aber zu schließen, daß die Hemmwirkung der Ätherphase pH 1,0 ebenfalls nicht auf eine einzelne Hemmsubstanz zurückzuführen ist, sondern daß eine ganze Anzahl unterschiedlicher Substanzen dafür verantwortlich zu machen ist.

BÖRNER (1956) konnte bei seinen Untersuchungen der gegenseitigen Beeinflussung höherer Pflanzen aus Getreidestroh p- Cumarsäure, p- Hydroxy- benzoessäure, Ferulasäure und Vanillinsäure isolieren. Seinen Untersuchungen nach reichen aber die in den Extrakten vorliegenden Mengen an p- Cumarsäure und p- Hydroxybenzoessäure allein nicht aus, um die durch Gerstenstrohextrakte noch bei einer Konzentration 1 : 400 erhaltene Hemmung des Wurzelwachstums bei Weizen zu erklären. Eine Reihe von Phenolcarbonsäuren fanden auch JAYACHANDRAN- NAIR und SRIDHAR (1975) in Extrakten aus Reisspelzen und schließen die Möglichkeit einer Beeinflussung des Keimlingwachstums durch diese Substanzen nicht aus.

An Hand von dünnschichtchromatographischen Trennversuchen der Ätherphase pH 1,0 war anzunehmen, daß die von BÖRNER aus Getreidestroh isolierten Phenolcarbonsäuren auch in den Extrakten aus Reisspelzen vorlagen. Photometrische Bestimmungen der Konzentrationen der jeweiligen Phenolcarbonsäure, die dem Extinktionswert der Ätherphase pH 1,0 entsprach, ergaben, daß keine

der getesteten Substanzen in der Lage war, im Biotest dieselbe Hemmung des Wurzelwachstums bei Keimlingen von *Amaranthus caudatus* hervorzurufen, wie die Ätherphase pH 1,0. Daraus ist aber zu entnehmen, daß neben diesen Phenolcarbonsäuren noch eine oder mehrere Substanzen mit Hemmwirkung vorliegen müssen.

In weiteren Untersuchungen konnten nach Methylierung der Ätherphase pH 1,0 mit Diazomethan mittels Gaschromatographie die Methylester von p- Cumarsäure, p- Hydroxy- benzoessäure, Vanillinsäure und Ferulasäure nachgewiesen und an Hand von definierten Mengen an Vergleichssubstanzen quantitativ bestimmt werden, wobei der Hauptpeak der p- Cumarsäure zuzuordnen war. Daneben ergab sich aus dem Gaschromatogramm der Ätherphase pH 1,0, daß neben den identifizierten Phenolcarbonsäuren noch einige weitere Substanzen vorlagen, bei denen es sich auf Grund ihres gaschromatographischen Verhaltens ebenfalls um Methylester von Phenolcarbonsäuren handeln und deren chemische Strukturen auf Grund ihrer Retentionszeiten eine Zwischenstellung zwischen p- Hydroxy- benzoessäure und Vanillinsäure einnehmen sollten.

Lösungen, die alle gaschromatographisch identifizierten Phenolcarbonsäuren in einer dem Spelzenextrakt entsprechenden 10- fachen Menge enthielten, konnten die Keimung von Samen von *Avena sativa* nicht beeinflussen und führten praktisch zu denselben Wurzel- bzw. Koleoptillängen wie die Wasserkontrollen, d.h., daß diese Substanzen alleine keinen hemmenden Einfluß auf die Keimung ausüben können. Welche Bedeutung den bislang noch nicht identifizierten Phenolcarbonsäuren zukommt, muß erst durch weitere Versuche geklärt werden. Es ist aber anzunehmen, daß auch sie bei der Keimungshemmung nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Die bei der Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 an Reverse- Phase Gel erhaltene Fraktion VI verursachte die stärkste Hemmung des Wachstums der Wurzeln von Keimlingen von *Amaranthus caudatus*. Diese Fraktion VI besteht aber nicht aus einer einzelnen Substanz, sondern setzt sich, wie das Elutionsdiagramm zeigt, aus einem Doppelpack zusammen, wobei die Hauptkomponente mittels Dünnschichtchromatographie als p- Cumarsäure identifiziert werden konnte. p- Cumarsäure kommt aber wegen der zu geringen Men-

gen in den Extrakten aus Haferspelzen als Keimungshemmstoff nicht in Frage. Vielmehr muß neben der p- Cumarsäure in der Fraktion VI der Gelfiltration der Ätherphase pH 1,0 an Reverse- Phase- Gel vorliegenden noch nicht identifizierten Substanz besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Bei dieser hochaktiven Substanz könnte es sich ebenfalls um eine Phenolcarbonsäure handeln, die aber nicht mit Diazomethan methylierbar ist und somit in den bisherigen nach Methylierung mit Diazomethan erhaltenen Gaschromatogrammen nicht gefunden werden konnte (persönliche Mitteilung von Frl. Lohaus, Bot. Inst., München).

Abscisisäure kommt als Keimungshemmstoff in Extrakten aus Haferspelzen nicht in Frage, da diese im Elutionsdiagramm bei der Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 an Reverse- Phase- Gel erst dann erscheint, wenn bereits alle Komponenten dieser Ätherphase von der Säule eluiert worden sind. Ferner ergibt Abscisisäure beim Ansprühen der Dünnschichtchromatogramme mit Nachweisreagenz eine andere Färbung als die in der Ätherphase pH 1,0 enthaltenen Substanzen.

Eine Beteiligung von Aminosäuren am Zustandekommen der Hemmwirkung des Haferspelzenextraktes, wie sie GRIMM (1952) und NIEMANN (1952) bei einer Reihe von Samenextrakten für möglich hielten und die GRESSEL und HOLM (1964) ausschließlich auf Aminosäuren bei Samen von *Abutilon theophrasti* zurückführten, konnte ausgeschlossen werden. Die bei der quantitativen Aminosäureanalyse eines 4- fach konzentrierten Haferspelzenextraktes ermittelten Mengen an Aminosäuren ergaben im Biotest dieselben Wurzel- bzw. Koleoptilenlängen wie die Wasserkontrollen, wogegen die 4- fach konzentrierte nach dem Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration des Haferspelzenextraktes bei verschiedenen pH- Werten mit Äther verbleibende wässrige Phase (diese sollte die Aminosäuren enthalten) das Wachstum dieser beiden Pflanzenorgane stark beeinflusste.

Weiterhin spielen Gerbstoffe, die von NIEMANN unter anderem als mögliche keimungshemmende Komponenten der Samenextrakte

angesehen wurden, keine Rolle, da alle auf Gerbstoffe ansprechenden durchgeführten Nachweisreaktionen negativ ausfielen, d.h., daß im Haferspelzenextrakt keine Gerbstoffe enthalten sind.

ELLIOTT und LEOPOLD (1952) konnten einen Antagonismus zwischen Haferspelzenextrakt und Indolyl- 3- essigsäure bei etioliierten Erbsensegmenten nachweisen. Dieselbe Erscheinung beobachtet man auch am intakten System der Haferkaryopsen. Auch hier wird die durch eine bestimmte Konzentration an Hemmstoff hervorgerufene Hemmung des Wachstums sowohl der Primärwurzeln als auch der Koleoptilen partiell durch Indolyl- 3- essigsäure aufgehoben, wobei die Stärke des Antagonismus abhängig ist von der Konzentration an Indolyl- 3- essigsäure. Bekannt ist bei einer großen Anzahl von Samen, daß die Keimruhe durch Gibberellinsäure aufgehoben werden kann, wobei ebenfalls ein Antagonismus zwischen keimungsverzögernden und keimungsfördernden Prozessen vorliegt.

3. Material und Methoden

=====

3.1. Geräte

Der Haferspelzenrohextrakt wurde nach Abkühlen (bei Hitzeextraktion der Haferspelzen) und Entfernen der Spelzen (Kaffeefilter) in der Kühlzentrifuge G 50 K (Fa. WKF, Brandau, Odenw.) abzentrifugiert. Dabei wurden mit dem Rotor 6 x 500 ml bei 10.000 Upm maximal 18.000 g erreicht. Zur Sedimentation der nach der Gefriertrocknung des Spelzenextraktes unlöslichen Partikel (denaturierte Proteine) genügte die Tischzentrifuge der Fa. Christ (Osterrode, Harz), Typ Junior I bei Stufe 10. Die für die Gaschromatographie und für die hochdruckflüssig-

chromatographischen Trennungen verwendeten Lösungen wurden vorher in der präparativen Ultrazentrifuge von WKF- Hitachi bei 30.000 Upm $\hat{=}$ max. 78.000 g abzentrifugiert (Rotor: RP 65 T). Zur Gefriertrocknung des Haferspелzenextraktes (Konzentrierung) und der bei den verschiedenen chromatographischen Verfahren erhaltenen Eluate diente die Gefriertrocknungsanlage L 2 der Fa. WKF (Brandau, Odenw.).

Die Transmission von Säuleneluaten bei der Gelfiltration wurde bei 254 nm mit dem Durchflußphotometer Serva chromatocord gemessen und gleichzeitig von einem Schreiber, Minicorder CF von Serva (Heidelberg) registriert.

Zur hochdruckflüssigchromatographischen Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 diente das Modell: 660 Solvent Programmer (Waters Associates, Königstein, Taunus), Chromatography pump 6000 A (Waters Associates, Königstein, Taunus), Universal liquid injektor model U 6 K (Waters). Zur Messung der Transmission des Säuleneluates diente das Spektralphotometer: Spectro Monitor II (Fa. Latek Labortechnik GmbH, Heidelberg) mit angeschlossenem Schreiber: BD 9, 2- Kanal- Flachsreiber von Kipp und Zonen (Delft, Holland).

Zur Auftrennung der bei den Großansätzen nach Ausschütteln des Spелzenextraktes bei pH 7,0 mit Äther erhaltenen Fraktion diente das Hochspannungselektrophoresegerät der Fa. Hölzl (Dorfen, Obb.).

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Haferspелzenextraktes erfolgte mit dem Aminosäureanalysator von Beckman: Modell 120 C.

Für die gaschromatographischen Untersuchungen diente der Gaschromatograph: Modell 23100 (Carlo Erba, Milano) mit angeschlossenem Autolab (Computing Integrator for Chromatography, System IV) der Fa. Spectra Physics.

Zur Aufnahme von UV- Absorptionsspektren diente die optische Einheit Uvicord II von LKB (Bromma, Schweden) mit angeschlossenem Unicam AR- 25 Linearschreiber. Die verwendeten Quarzglasküvetten hatten eine Schichtdicke von $d = 1$ cm.

3.2. Dünnschichtchromatographie

3.2.1. Kieselgelplatten

Für Herstellung der Kieselgelplatten wurden 30 g Kieselgel GF₂₅₄ (Fa. Merck, Darmstadt) und 60 ml dest. Wasser kräftig geschüttelt und mittels des Plattenstreichgerätes (Fa. Desaga, Heidelberg) auf vorher mit Aceton gereinigte, fettfreie Glasplatten der Größe 20 x 20 cm aufgetragen (Schichtdicke: 0,25 bzw. 0,50 mm). Nach dem Ausstreichen des Kieselgels wurden die Platten vorsichtig geschüttelt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Die ausgestrichenen Platten blieben eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen und wurden dann eine Stunde lang bei 100°C im Trockenschrank aktiviert. Die so vorbereiteten Chromatographieplatten wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung im Exsikator über Silicagel- Trockenperlen aufbewahrt.

Alle zur Anwendung gekommenen Fließmittel sind nachfolgend aufgeführt.

Fließmittel	Zusammensetzung
Benzol / Aceton	90 / 10
Toluol / Chloroform / Aceton	40 / 25 / 35
Petroläther / Diäthyläther	90 / 10
Petroläther / Diäthyläther / Eisessig	90 / 10 / 1
Benzol / Aceton	50 / 50
Benzol / Aceton	80 / 20
Essigester / Butanon / Ameisensäure. / H ₂ O	50 / 50 / 10 / 10
Toluol / Chloroform / Aceton	40 / 25 / 35
Benzol / Essigester	50 / 50
Benzol / Äthylacetat	3 / 1
Benzol / Dioxan / Äthylacetat	90 / 25 / 4
Benzol / Dioxan / Essigsäure	95 / 25 / 4
Benzol / Methanol / Essigsäure	120 / 15 / 6
Benzol / Methanol / Essigsäure	90 / 16 / 8

3.2.2. Cellulose- Dünnschichtplatten

Zur Herstellung von Cellulose- Dünnschichtplatten wurden 15 g Cellulose (Fa. Macherey und Nagel) MN 300 und 50 ml dest. H_2O + 50 ml Methanol kurzzeitig im Mixer homogenisiert und ebenfalls mit dem oben aufgeführten Streichgerät aufgetragen. Nach dem Ausstreichen wurden die Platten an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur und Raumfeuchtigkeit bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

Die zur Anwendung gekommenen Fließmittel sind nachfolgend aufgeführt.

Fließmittel	Zusammensetzung
n- Hexan	
Butanon	
n- Hexan / Butanon	100 / 1
n- Hexan / Butanon	98 / 2
n- Hexan / Butanon	97 / 3

3.3. Gewinnung von peroxidfreiem Äther

Der zur Extraktion des Haferspелzenextraktes bei verschiedenen pH- Werten verwendete peroxidfreie Äther wurde nach der Methode von LARSEN (1955) gewonnen. Hierzu wurde 1 l Rohäther mit 0,5 g fein zerstoßenem Calciumoxid und 2,5 g Eisen- II- sulfat und ca. 25 ml dest. Wasser ca. 3 min lang kräftig geschüttelt, dann die grau- bis braungrüne (bei starker Verunreinigung braune) wässrige Phase verworfen. Dieses Verfahren wurde noch zweimal wiederholt und anschließend der Äther im Wasserbad (ca. $40^{\circ}C$) destilliert. Die ersten 50 ml (diese enthalten die leicht flüchtigen Verunreinigungen) und die letzten 100 ml (Peroxide) wurden verworfen. Der destillierte Äther wurde bis zu seiner weiteren Verwendung im Tiefkühlfach aufbewahrt, wobei noch ein großer Teil des überdestillierten Wassers ausgefroren wurde und somit der Äther ziemlich wasserfrei war. Zur Herstellung

„absoluten Äthers“ wurde frisch geschnittenes Natrium (in Drahtform gepreßt) als Trockenmittel verwendet.

5.4. Darstellung von Diazomethan aus N- Methyl- N- nitroso- p- toluolsulfonamid

In einem 50 ml Destillierkolben mit langem Ansatz, Tropftrichter und ausreichender Kühlung gibt man eine Lösung von 5 g KOH in 5 ml dest. Wasser, 17 ml „Carbitol“ und 5 ml Äther. Man erhitzt die Mischung auf dem Wasserbad auf 70 - 75°C. Sobald der Äther zu destillieren beginnt, gibt man eine Lösung von 10 g N- Methyl- N- nitroso- p- toluolsulfonamid in ca. 60 ml Äther innerhalb 1/4 Stunde durch den Tropftrichter zu. Während der Destillation wird der Destillationskolben gerührt oder geschüttelt. Man sammelt das Destillat in einer gekühlten Vorlage.

Diazomethan ist äußerst cancerogen und explosiv. Daher muß unter dem Abzug gearbeitet werden. Die hergestellte ätherische Lösung von Diazomethan wird bei möglichst tiefen Temperaturen (Tiefkühlfach) aufbewahrt.

Zur Überführung der organischen Säuren in ihre Methylester versetzt man 1 ml der ätherischen Lösung (wasserfrei) mit 2 ml Methanol p.A. und einer Lösung von Diazomethan in Äther, bis eine Gelbfärbung bestehen bleibt. Bei vorzeitigem Verschwinden der Gelbfärbung wird noch etwas Diazomethan zugesetzt. Nach ca. 2 Stunden engt man die Lösung am Rotationsverdampfer, ohne zu erwärmen, ein, nimmt den Rückstand in einem definierten Volumen an n- Hexan auf und verwendet diese Lösung zur gaschromatographischen Bestimmung.

3.5. Pflanzenmaterial

a) zur Gewinnung von Haferspelzenextrakten

Für einen Teil der durchgeführten Versuche wurde Saathafer

(*Avena sativa* L.) der Sorte „Husar“ (Ernte 1974, Baywa Zentral-lager Feldkirchen) verwendet. Das Saatgut wurde dabei von Hand entspelzt. Daneben wurden aber auch Spelzen verwendet, die bei der Herstellung von Haferkörnerprodukten als Abfall anfallen (Bezugsquelle: Mayer- Mühle, Landshut). Da dieses Spelzenmaterial stark verunreinigt war, mußte es vor Verwendung erst gesäubert werden. Dazu wurde das Material zunächst sorgfältig mittels eines Drahtsiebes mit einer Maschenweite von ca. 1,3 mm vorgereinigt. Hierbei wurden die Samenhaare der Karyopsen, Staub und die bei der maschinellen Entspelzung anfallenden kleinen Bruchstücke von Karyopsen entfernt. Die im Sieb verbliebenen Spelzen wurden nochmals kurz (um größere Verluste an Haferspelzen zu vermeiden) über ein Sieb mit einer Maschenweite von ca. 2 - 4 mm gereinigt. Hierbei wurden vor allem Haferkaryopsen und grössere Karyopsenbruchstücke abgetrennt. Nach diesem Reinigungsschritt wurde das im Sieb verbliebene Material von Hand verlesen und dabei zurückgehaltene Karyopsen, Pflanzenteile oder Samen anderer Pflanzen entfernt, so daß zum Schluß ein sauberes, von Verunreinigungen freies Ausgangsmaterial für die Untersuchungen erhalten wurde.

b) für den Biotest

Jeder qualitativ hochwertige Samen, der zwischen 90 und 100 % keimt, kann als Versuchsmaterial Verwendung finden. Zur Durchführung von Biotests wurden sowohl Samen von monokotylen als auch von dikotylen Pflanzen verwendet. Die Samen der monokotylen Pflanzen wurden vor ihrer Aussaat entspelzt, Samen von dikotylen Pflanzen wurden mit Samenschale ausgesät.

Samen folgender monokotyler Pflanzen wurden für die Keimtests verwendet:

Saathafer (*Avena sativa* L.), Sorte „Husar“

Silberhirse (*Sorghum spec.*), Fa. Dehner, Rain a. Lech

Glanz (*Phalleris spec.*), Fa. Dehner, Rain a. Lech

Samen folgender dikotyler Pflanzen wurden für die Keimtests verwendet:

Rettich (*Raphanus spec.*), Sorte „Münchner Bier“

Fuchsschwanz (*Amaranthus caudatus*), Fa. Dehner, Rain a. Lech

Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.), Fa. Dehner, Rain a. Lech

3.6. Biotest

Zur Durchführung von Keimtests wurden Plastik- Petrischalen ($\varnothing = 9$ cm) verwendet, die mit zwei Lagen Filtrierpapier ausgelegt waren. In die Schalen wurden jeweils 6 ml der zu prüfenden Lösung einpipettiert und gleichmäßig verteilt. Nach Aussaat der Samen (25 Stück pro Schale) wurden die Petrischalen mit den dazugehörigen Deckeln verschlossen und bei 27°C in völliger Dunkelheit im Brutschrank 48 Stunden lang gekeimt. Die relative Luftfeuchtigkeit des Brutschrankes betrug über 90 %, so daß ein Verdunsten der Testflüssigkeiten während der Keimdauer nicht zu erwarten war.

Bei der Aussaat von Samen von *Amaranthus caudatus* wurden wegen der Kleinheit der Samen statt der sonst üblichen 6 ml nur 4 ml an Testlösung verwendet. Bei den nach der Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 mittels HPLC- Chromatographie erhaltenen Säuleneeluaten wurden wegen der geringen Volumina der zur Verfügung stehenden Testlösungen Samen von *Amaranthus caudatus* in Glas-Petrischalen ($\varnothing = \text{ca. } 4$ cm), die nur mit einer Lage Filtrierpapier und nur mit 1 ml an Testlösung versehen waren, gekeimt. Als Kontrollösung diente in allen Fällen dest. Wasser.

Für die quantitativen Bestimmungen wurden bei Hafersaatgut nach der Keimzeit die Längen der Primärwurzeln bzw. der Koleoptilen, bei Keimlingen von *Amaranthus caudatus* die Längen von der Wurzelspitze bis zum Hypokotylhaken ausgemessen.

3.7. Extraktionsmethoden

3.7.1. Extraktion der Haferspelzen bei 27°C

40 g Haferspelzen (unzerkleinert oder nach Zerreiben in flüs-

siger Luft) wurden bei 27°C im Dunkeln in 300 ml dest. Wasser 48 - 72 Stunden extrahiert. Nach der Extraktionszeit wurde der Rohextrakt abfiltriert und das Filtrat für die weiteren Untersuchungen verwendet (= Haferspelzenextrakt). Bei dieser Extraktionsmethode wurde ein starkes Wachstum von Bakterien beobachtet. Da die Anwesenheit von Bakterien zur Inaktivierung des Extraktes führen kann (siehe Seite 14), wurden die Extraktionen bei 4°C und vor allem die Hitzeextraktion bevorzugt. Das Wachstum von Bakterien konnte durch Zusatz von 100 mg / l Extraktionsmedium an Natriumazid bzw. Preventol weitestgehend verhindert werden.

3.7.2. Extraktion der Haferspelzen bei 4°C

60 g Haferspelzen wurden in 400 ml dest. Wasser 48 Stunden bei 4°C (Kühlkammer) im Dunkeln extrahiert und der Extrakt in der Kühlzentrifuge 20 min. lang bei 10.000 Upm $\pm$ 12.000 g abzentrifugiert (Überstand = Haferspelzenextrakt).

Für die Großansätze (zur Gewinnung der Ätherphase pH 7,0 für die Papier- Hochspannungselektrophorese und der Neutralsubstanzen der Ätherphase pH 7,0 nach der Abtrennung der geladenen Substanzen mittels Ionenaustauscherchromatographie) wurden 1000 g Haferspelzen in einem 5 l Enghals- Erlenmeyerkolben gegeben und soweit mit dest. Wasser aufgefüllt (ca. 4 l), bis die Spelzen ganz bedeckt waren und dann ebenfalls 48 Stunden lang bei 4°C im Dunkeln extrahiert. Nach Beendigung der Extraktionszeit wurde abfiltriert (Filtrat = Haferspelzenextrakt).

3.7.3. Hitzeextraktion der Haferspelzen

60 g bzw. 90 g Haferspelzen wurden in 500 ml bzw. 750 ml dest. Wasser in einem 1 l bzw. 2 l Rundkolben eine Stunde lang unter Rückfluß gekocht (Zeit ab Siedebeginn). Nach Abkühlen wurde über ein Sieb abgossen und anschließend in der Kühlzentrifuge bei 10.000 Upm $\pm$ 12.000 g 20 min lang abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen, der Überstand (= Haferspel-

zenextrakt) für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Der durch Quellwasseraufnahme bedingte Verlust an Extraktionsflüssigkeit blieb in allen Fällen unberücksichtigt. Es zeigte sich aber, daß die Volumina der erhaltenen Spelzenextrakte bei zahlreichen Wiederholungsversuchen nur um $\pm 2\%$ schwankten.

Um für die Untersuchungen hochwirksame hemmstoffhaltige Lösungen zu erhalten, war es erforderlich, die bei den verschiedenen Extraktionsmethoden erhaltenen Haferspelzenextrakte zu konzentrieren. Die Konzentrierung der Extrakte, sowie auch der bei den verschiedenen säulenchromatographischen Trennverfahren erhaltenen Fraktionen erfolgte durch Gefriertrocknung. Von einer Konzentrierung der Haferspelzenextrakte (Extraktion bei 27°C und bei 4°C) durch Abblasen mittels eines Luftstromes (Ventilator) wurde Abstand genommen, da hierzu ein relativ hoher Zeitaufwand erforderlich war und ferner das Wachstum von Bakterien nicht unterbunden wurde, wie dies bei der Gefriertrocknung der Fall war.

3.8. Auftrennung des Haferspelzenextraktes mittels Gelfiltration an Acrylex- P 2 und Bio- Gel- P 2

Der durch Hitzeextraktion aus 90 g Haferspelzen und 750 ml dest. Wasser erhaltene Spelzenextrakt (ca. 600 ml - 610 ml) wurde gefriergetrocknet. Nach Trocknung wurde der Rückstand in 100 ml dest. Wasser aufgenommen und ca. 15 min gerührt. Unlösliche Teilchen wurden an der Tischzentrifuge ca. 10 min bei Stufe 10 sedimentiert und der Überstand auf eine mit Acrylex- P 2 gefüllte und mit dest. Wasser equilibrierte Säule ($\varnothing$ 10 cm, Höhe des Gelbettes ca. 26 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit dest. Wasser eluiert (Durchfluß ca. 250 ml / h). Die Transmission des Säuleneluates wurde bei 254 nm registriert. Hierbei wurden drei Fraktionen erhalten (siehe Abb. 3, Seite 17). Die getrennten Fraktionen (Peak I - III) wurden anschließend gefriergetrocknet.

Der wie oben erhaltene Haferspelzenextrakt wurde nach Gefriertrocknung in ca. 15 ml dest. Wasser gelöst, an der Tischzen-

trifuge abzentrifugiert und der Überstand auf ein Volumen von 15 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Davon wurde dann jeweils 1 ml auf eine mit Bio- Gel- P 2 gefüllte Säule aufgetragen ($\varnothing$ der Säule = 1 cm, Höhe des Gelbettes = 100 cm). Auch in diesem Fall wurde die Säule mit dest. Wasser eluiert. Hierbei wurde im wesentlichen dieselbe Trennung des Haferspелzenextraktes wie über Acrylex- P 2 (siehe Seite 17) erhalten. Die Säule hatte aber den Nachteil, daß auf Grund der geringen Füllmenge an Trenngel nur geringe Volumina (ca. 1 ml) der zu trennenden Lösung aufgetragen werden konnten.

3.9. Auftrennung der bei der Gelfiltration des Haferspелzenextraktes an Acrylex- P 2 erhaltenen Fraktion II durch Ausschütteln mit Äther bei verschiedenen pH- Werten

Die bei der Gelfiltration des Spелzenextraktes an Acrylex- P 2 erhaltene Fraktion II (siehe Abb. 3, Seite 17) wurde nach der Gefriertrocknung in 100 ml dest Wasser gelöst und ca. 10 min gerührt (pH- Wert dieser Lösung in verschiedenen Versuchen 6,8 - 7,2). Der pH- Wert wurde mit 5 %- iger H_2SO_4 bzw. mit 5 %- iger $NaHCO_3$ - Lösung auf pH 7,0 eingestellt und anschließend drei Mal mit je 100 ml dest. Äther (peroxidfrei) ausgeschüttelt = Ätherphase pH 7,0.

Die verbleibende wässrige Phase wurde dann mit 5 %- iger H_2SO_4 auf pH 1,0 eingestellt und ebenfalls drei Mal mit je 100 ml dest. Äther ausgeschüttelt = Ätherphase pH 1,0.

Die jeweils gesammelten und vereinigten Ätherphasen wurden am Rotationsverdampfer vom Äther befreit und dann in den entsprechenden Mengen an Lösungsmitteln aufgenommen.

Wegen der schlechten Löslichkeit des Rückstandes der Ätherphase pH 1,0 in dest. Wasser wurde nach Zusatz der entsprechenden Menge an dest. Wasser ca. 20 min lang im Wasserbad erhitzt, wobei der Hauptanteil der darin enthaltenen Substanzen in Lösung ging. Beim Abkühlen war eine leichte Trübung zu beobachten, die auf ein Ausfallen von Substanzen mit einer geringen Löslichkeit

in Wasser zurückzuführen ist. Daher wurde die Lösung an der Tischzentrifuge ca. 10 - 15 min bei Stufe 10 abzentrifugiert und nur der klare Überstand für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die nach Ausschütteln bei pH 1,0 mit Äther verbliebene stark saure wässrige Phase wurde zunächst mit gesättigter Bariumhydroxid- Lösung versetzt, bis pH 7,0, unter ständiger Kontrolle des pH- Wertes. Dabei werden die Sulfationen der Schwefelsäure als schwerlösliches Bariumsulfat ausgefällt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde an der Tischzentrifuge bei Stufe 10 sedimentiert und verworfen. Ein eventuell vorhandener Überschuss an Bariumhydroxid in der überstehenden Lösung sollte durch einstündiges Einleiten von CO_2 als ebenfalls in Wasser schwerlösliches Bariumcarbonat ausgefällt werden. Eine Trübung der Lösung nach Einleiten von CO_2 konnte aber in keinem Fall festgestellt werden. Anschließend erfolgte die Konzentrierung der Lösung mittels Gefriertrocknung.

3.10. Auftrennung der Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0 und der
nach Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration
mit Äther verbleibenden wässrigen Phase durch Hochdruck-
flüssigchromatographie

3.10.1. Trennung auf CPG 10 bzw. Lichrosorb SI 100

Die Auftrennung der nach dem Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration an Acrylex- P 2 mit Äther bei verschiedenen pH- Werten verbleibenden wässrigen Phase erfolgte gelchromatographisch mit CPG 10 (Controlled Pore Glass): 75 Å Porendurchmesser, 80 - 100 mesh Teilchengröße.

Weiterhin wurden die Fraktion II der Gelfiltration des Hafer-
spelzenextraktes an Acrylex- P 2, sowie die durch Ausschütteln
der Fraktion II mit Äther bei verschiedenen pH- Werten erhaltenen
Ätherphasen pH 7,0 und pH 1,0, sowie die verbleibende
wässrige Phase gel- und adsorptionschromatographisch an Lichro-

sorb SI 100: 100 Å Porendurchmesser, 5 µm Teilchengröße, aufgetrennt.

Als Elutionsmittel wurden verwendet:

Wasser	-
Äthanol / Wasser	30 / 70
Äthanol / Wasser	50 / 50
Äthanol / Wasser	80 / 20
Methanol / Wasser	80 / 20

Länge der Säule: 50 cm, Durchmesser: 4 mm, Detektion: UV- Absorption bei 240 nm, Einspritzmenge: 5 bzw. 10 µl, Elutionsmittelfluß: 0,2 - 1,2 ml / min

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind auf Seite 28 dargestellt.

3.10.2. Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 an Reverse- Phase-Gel

Hierzu wurde der Rückstand der Ätherphase pH 1,0 (siehe Seite 75) nach Abziehen des Äthers am Rotationsverdampfer in 3 ml dest. Wasser aufgenommen, ca. 15 min erhitzt und nach dem Abkühlen (Trübung der Lösung) eine Stunde lang in der Ultrazentrifuge bei 30.000 Upm $\hat{=}$ max. 78.000 g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit Wasser wieder auf 3 ml aufgefüllt ($\hat{=}$ 200- facher Konzentration bezogen auf das Volumen des Huferspelzenextraktes, 90 g Spelzen als Ausgangsmaterial). Säule: Reverse- Phase 33951 / µC 18 (P / N 2734), Länge: 30 cm Elutionsmittel: Gradientenelution mit einem Methanol- Wasser- gemisch, beginnend mit MeOH / Wasser = 10 / 90 $\rightarrow$ MeOH / Wasser = 30 / 70. Dauer des Gradienten: 20 min Detektion: UV- Absorption bei 254 bzw. 280 nm Einspritzmenge: 50 µl Elutionsmittelfluß: 1,5 ml / min

Bei der Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 mittels Hochdruck- flüssigchromatographie wurden sieben relativ gut voneinander getrennte Fraktionen erhalten (vergl. Abb. 11, Seite 30).

3.11. Auftrennung der Ätherphase pH 7,0 mittels Hochspannungs- elektrophorese

Zur Auftrennung der bei den Großansätzen (1 kg Haferspelzen, Extraktion bei 4°C) nach Ausschütteln des Haferspelzenextraktes mit Äther bei pH 7,0 erhaltenen Ätherphase diente die Hochspannungselektrophorese von H. Hölzl. Für die Elektrophorese wurden die zu untersuchenden Substanzen in wenig Äther oder Methanol aufgenommen und auf das mit Pufferlösung gleichmäßig befeuchtete Papier (Chromatographiepapier: Whatman Nr. 1) punkt- bzw. bandförmig bei der präparativen Trennung aufgetragen.

Puffer: Pyridin- Eisessig- Puffer pH 6,1, bestehend aus 5 ml Eisessig, 75 ml Pyridin und 1000 ml dest. Wasser.

Leistung des Gerätes: ca. 300 Watt. Die Leistung wurde während der Laufzeit mehrmals nachreguliert.

Laufzeit: ca. 110 min. Nach Beendigung der Laufzeit wurde die Pufferlösung im leichten Luftstrom abgedampft. Nach Ausschneiden eines ca. 1 cm breiten Streifens wurden auf diesem die Substanzflecke im kurz- bzw. langwelligen UV- Licht und mittels geeigneter Sprühreagenzien lokalisiert. Die den Substanzflecken des Papierstreifens entsprechenden Banden des unbehandelten Chromatogrammes wurden ausgeschnitten und mehrmals mit Methanol eluiert. Nach dem Abrotieren des Methanols wurden die Rückstände in entsprechenden Volumina Wasser aufgenommen und dann im Keimtest eingesetzt. Hierbei konnte festgestellt werden, daß der Hauptanteil der keimungshemmenden Substanzen sich unter den genannten Bedingungen neutral verhält, d.h., an den Auftragepunkten sitzenbleibt, während die geladenen Substanzen entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld wandern.

3.12. Entfernung geladener Substanzen aus der Ätherphase pH 7,0 durch Mischbett- Ionenaustauscher- Chromatographie

Zur Adsorption der geladenen Substanzen der Ätherphase pH 7,0

diente der Mischbett- Ionenaustauscher V der Fa. Merck. Hierzu wurden die in der Ätherphase pH 7,0 enthaltenen Substanzen nach Abrotieren des Äthers in ca. 40 ml dest. Wasser gelöst (unlöslicher Rückstand wurde verworfen) und über eine mit Mischbett- Ionenaustauscher V gefüllte Säule ($\varnothing$ der Säule = 2 cm, Höhe des Gelbettes = ca. 15 cm) geschickt. Die Säule wurde mit dest. Wasser eluiert, die Detektion des Eluates erfolgte bei 254 nm. Zur Konzentrierung wurde das Eluat drei Mal mit dest. Äther ausgeschüttelt und nach Abziehen des Äthers für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

3.13. Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Haferspelzenextraktes

Der durch Hitzeextraktion aus 60 g Haferspelzen und 500 ml dest. Wasser erhaltene Spelzenextrakt (= 396 ml) wurde nach der Gefriertrocknung in ca. 90 ml dest. Wasser aufgelöst, 20 min lang in der Kühlzentrifuge bei 10.000 Upm $\pm$ max. 18.000 g abzentrifugiert und der klare Überstand auf 99 ml mit dest. Wasser aufgefüllt (entspr. der 4- fachen Konzentration des Ausgangsextraktes). Davon wurden 0,5 ml direkt, weitere 0,5 ml nach saurer Hydrolyse der Aminosäureanalyse unterzogen.

Gerät: Beckman, Modell 120 C

Puffer A: Citratpuffer 0,2 n, pH 3,24

Puffer B: Citratpuffer 0,7 n, pH 4,20

Auftragspuffer: Citratpuffer 0,2 n, pH 2,2

Temperatur: 30°C mit Gradient nach 55°C

Als Säulenfüllmaterial wurde das Beckman- Harz M 72 verwendet. Hydrolysebedingungen: Dauer 16 Stunden bei 100°C mit 4 n HCl. Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren erfolgte photometrisch nach Versetzen mit Ninhydrin- Reagenz gegen bekannte Aminosäuren genau definierter Mengen.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Aminosäuremengen sind auf Seite 53 dargestellt.

3.14. Quantitative Bestimmung der in der Ätherphase pH 1,0
enthaltenen Phenolcarbonsäuren mittels Gaschromato-
graphie

Hierzu wurde der Haferspelzenextrakt (60 g Haferspelzen / 500 ml dest. Wasser) nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (10.000 Upm $\approx$ max. 18.000 g) = 395 ml gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 100 ml dest. Wasser aufgenommen und an der Tischzentrifuge ca. 15 min bei Stufe 10 zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zunächst auf einen pH- Wert von 7,0 eingestellt und drei Mal mit je 100 ml dest. Äther ausgeschüttelt. Die verbleibende wässrige Phase wurde dann mit 5 % iger H_2SO_4 auf pH 1,0 eingestellt und ebenfalls drei Mal mit je 100 ml dest. Äther ausgeschüttelt = Ätherphase pH 1,0. Der Rückstand dieser Ätherphase wurde nach dem Abziehen des Äthers am Rotationsverdampfer in 15 ml Methanol aufgenommen und davon 1 ml mit Diazomethan methyliert (siehe Seite 70). Nach Methylierung wurde das überschüssige Diazomethan und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 5 ml n- Hexan aufgenommen.

Bei den Vergleichssubstanzen wurden je 10 mg in 10 ml Methanol aufgenommen und davon 1 ml nach demselben Verfahren mit Diazomethan methyliert, dann ebenfalls überschüssiges Diazomethan und Lösungsmittel abgezogen und die Rückstände in jeweils 2 ml n- Hexan aufgenommen. Von den zu testenden Lösungen wurde jeweils 1 μ l in den Gaschromatographen gespritzt.

Bedingungen: Säule: Glaskapillarsäule belegt mit SF 96, Länge der Säule = 50 m

Trärgas: Wasserstoff (0,6 atü)

Injektortemperatur: 225°C

Programm: 5°C / min von 100°C bis 220°C

Die quantitative Bestimmung der Phenolcarbonsäuremengen der Ätherphase pH 1,0 erfolgte durch Vergleich der Peakflächenverhältnisse (jeweils Mittelwert aus mehreren Bestimmungen) mit denen, die durch Einspritzen von je 1 μ l der in n- Hexan

gelösten methylierten Vergleichssubstanzen (ebenfalls Mittelwert aus mehreren Bestimmungen) erhalten wurden.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

=====

1. Keimungshemmende Extrakte konnten sowohl aus den Spelzen von verschiedenen Saathaferensorten (*Avena sativa* L.) als auch von Wildhafer (*Avena fatua* L.) erhalten werden.
2. Bei den keimungshemmenden Substanzen aus Haferspelzenextrakten von *Avena sativa* L. handelt es sich nicht um art-spezifisch wirkende Substanzen, sondern diese hemmen sowohl die Keimung der Samen von monokotylen als auch von dikotylen Pflanzen, jedoch ist ihre keimungshemmende Wirkung auf Samen verschiedener Pflanzenarten unterschiedlich stark ausgeprägt.
3. Bei den Hemmsubstanzen handelt es sich um hitzestabile Verbindungen. Daher wurde auch für die meisten Untersuchungen die Hitzeextraktion der Spelzen angewendet, da hierbei höhere Ausbeuten an Hemmstoffen erzielt werden konnten.
4. Auf Grund von Dialyseversuchen und der gelochromatographischen Auftrennung des Haferspelzenextraktes an Acrylex-F 2 sollte es sich bei den Keimungshemmstoffen in überwiegendem Maße um Substanzen mit relativ niedrigen Molekulargewichten handeln.
5. Als Grundlage der quantitativen Bestimmungen diente der Biotest (Keimtest), wobei die prozentualen Längenwerte der Primärwurzeln bzw. der Koleoptilen von Haferkaryopsen gegenüber den Längenwerten der Wasserkontrollen zu Grund gelegt wurden.
6. Durch die Darstellung der Dosis-Wachstums-Kurven (Dose-Response-Diagrammen), war es möglich, die Effektivität der keimungshemmenden Substanzen in den bei den einzelnen Trennungsschritten erhaltenen Fraktionen in Hemmeinheiten auszu-drücken.

ken. Als willkürlicher Bezugspunkt wurden dabei diejenigen Konzentrationen der getesteten Lösungen gewählt, bei denen eine Hemmung des Längenwachstums der Primärwurzeln der Haferkaryopsen von 20 % erhalten wurde.

Hiernach treten merkliche Verluste bei der Gefriertrocknung des Haferspelzenextraktes auf (leicht flüchtige Substanzen). Bei der Gelfiltration des gefriergetrockneten Spelzenextraktes an Acrylex- P 2 wird der Hauptanteil der Hemmwirkung in Fraktion II gefunden (relativ niedermolekulare Substanzen).

Bei den durch Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration des Haferspelzenextraktes mit Äther bei verschiedenen pH- Werten erhaltenen Ätherphasen wird der Hauptanteil an Hemmeinheiten in der Ätherphase pH 1,0 gefunden (organische Säuren). Daneben wird auch eine große Anzahl von Hemmeinheiten in der nach dem Ausschütteln des Spelzenextraktes mit Äther verbleibenden wässrigen Phase gefunden (amphotere Substanzen).

7. Bei den keimungshemmenden Substanzen der Ätherphase pH 7,0 handelt es sich in überwiegendem Maße um Neutralsubstanzen.
8. In der Ätherphase pH 1,0 konnten gaschromatographisch vier Phenolcarbonsäuren identifiziert werden, die in ihrer Gesamtheit jedoch nicht in der Lage waren, die Hemmwirkung der Ätherphase pH 1,0 zu erklären.
9. Abscisinsäure konnte bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Ätherphase pH 1,0 auf Kieselgel- Dünnschichtplatten nicht nachgewiesen werden. Außerdem erscheint sie bei der gelchromatographischen Trennung der Ätherphase pH 1,0 an Reverse- Phase- Gel erst dann im Eluat bei einer Retentionszeit, bei der die Substanzen der Ätherphase pH 1,0 bereits von der Säule eluiert worden sind und scheidet deshalb als eine der keimungshemmenden Substanzen der Ätherphase pH 1,0 aus.
10. Proteinogene Aminosäuren konnten im Haferspelzenextrakt

quantitativ bestimmt werden. Sie spielen jedoch bei der Keimungshemmung wegen ihrer zu geringen Konzentrationen keine Rolle.

11. Gerbstoffe konnten im Haferspelzenextrakt nicht nachgewiesen werden und kommen somit als keimungshemmende Substanzen des Spelzenextraktes nicht in Frage.
12. Es wurde ein antagonistischer Effekt zwischen Haferspelzenextrakt und Indolyl- 3- essigsäure beobachtet, wobei das Phytohormon in der Lage war, die keimungshemmende Wirkung des Haferspelzenextraktes partiell aufzuheben.

5. Literaturverzeichnis

- =====
- ADDICOTT, F.T., Biochemoccal aspects of the action of abscisic acid. Plant growth substances, 1970, Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 272
- ATWOOD, W.M., A physiological study of the germination of *Avena fatua*. Botanical Gazette 57, 386 (1914)
- BARNETT, J.P., Delayed germination of southern pine seeds related to seed coat constraint. Canadian J. of Forest Research 6, no. 4, 504, (1976)
- BELDEROK, B., Studies on dormancy in wheat. Mitt. int. Verein Samenkontrolle 26 (1961)
- BLACK, M., Dormancy studies in seed of *Avena fatua*. Canadian J. Botany 37, 393 (1959)
- BÖRNER, H., Untersuchungen über phenolische Verbindungen aus Getreidestroh und Getreiderückständen. Die Naturwissenschaften 42, 583 (1955)
- BÖRNER, H., Der papierchromatographische Nachweis von Ferulasäure in wässrigen Extrakten von Getreidestroh und Getreiderückständen. Die Naturwissenschaften 43, 129 (1956)
- BÖRNER, H., Die Abgabe organischer Verbindungen aus den Karyopsen, Wurzeln und Ernterückständen von Roggen (*Secale cereale* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und ihre Bedeutung bei der gegenseitigen Beeinflussung der höheren Pflanzen. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 33, Heft 1, 33 (1957)
- ELLIOTT, B.B. und LEOPOLD, A.C., An inhibitor of germination and of amylase activity in oat seeds. Physiol. Plantarum 6, 65 (1953)
- EVENARY, M., Germination inhibitors. The botanical Review 15, 153 (1949)
- GARDENER, C.J., Mechanisms regulating germination in seeds of *Styolantes*. Aust. J. Agric. Res. 26, 281 (1975)
- GOLDBACH, H. und MICHAEL, G., Absciscic acid content of barley grains during ripening as affected by temperature and variety. Crop Science 16, 797 (1976)

- GRESSEL, J.B. und HOLM, L.G., Chemical inhibition of crop germination by weed seeds and the nature of inhibition by *Abutilon theophrasti*. Weed Res. 4, 44 (1964)
- GRIMM, H., Zur Physiologie und mikrobiologischen Beeinflussung genuiner Hemmstoffe von *Digitalis purpurea* L. Zeitschrift für Botanik 41, 405 (1953)
- GROHNE, U., Untersuchungen zur Frage der Lichtkeimung bei *Digitalis purpurea* L. Dissertation Braunschweig (1949); Biol. Zbl. 71, 10 (1952)
- HAY, J.R., Experiments on the mechanism of induced dormancy in wild oats, *Avena fatua* L. Canadian J. of Botany 40, 191 (1962)
- HERRMANN, K., Über Oxyzimtsäuren in Getreideblättern. Die Naturwissenschaften 45, 111 (1958)
- HESS, D., Pflanzenphysiologie. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1970
- IVES, S.A., Maturation and germination of seeds of *Ilex opaca* Botanical Gazette 76, 60 (1923)
- JAYACHANDRAN- NAIR, K. und SRIDHAR, R., Phenolic compounds in rice husk. Biologia Plantarum 17 (4), 318 (1975)
- KATO, T., TSUNAKAWA, M., SASAKI, N., AIZAWA, H., FUJITA, K., KITAHARA, Y. und TAKAHASHI, N., Growth and germination inhibitors in rice husks. Phytochemistry 16, 45 (1977)
- KETRING, D.L., Germination inhibitors. Seed Sci. & Technol. 1, 305 (1973)
- KIESSLING, L., Untersuchungen über die Keimung der Getreide. Landw. Jahrb. (Bayern) 1, 449 (1911)
- KOMMEDAHL, T., DEVAY, J.E. und CHRISTENSEN, C.M., Factors affecting dormancy and seedling development in wild oats. Weeds 6, 12 (1958)
- LARSEN, P., PEACH, K. und TRASEY, M.V., Growth substances in higher plants in modern methods of plant analysis. Springer Verlag B.G.H. 1955, Vol III, 565
- LEPP, N.W., The effect of vanadium on germination and seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.C.V. Salad Bowl). Z. Pflanzenphysiol. 83, 185 (1977)

- LUDWIG, H. und JUNGES, W., Entstehungsbedingungen und Aufhebung der primären Keimruhe bei Braugerste. Versuchs- und Untersuchungswesen 9, (1963)
- MAYER, A.M. und POLJAKOFF- MAYBER, A., The germination of seeds. Pergamon Press London (1963)
- MILBORROW, B.V., The identification of (+)- Abscisin II [(+)- Dormin] in plants and measurement of its concentrations. *Planta* 76, 93 (1967)
- MOEWUS, F., Der Kressewurzeltest, ein neuer quantitativer Wuchsstofftest. *Biol. Zbl.* 68, 118 (1949)
- MORITA, H., Identification of phenolic acids by gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of chromatography* 71, 149 (1972)
- MOTT, J.J., Mechanisms controlling dormancy in the arid zone grass *Aristida contorta*. I: Physiology and mechanisms of dormancy. *Aust. J. Bot.* 22, 635 (1974)
- MOTT, J.J. und TYNAN, P.W., Mechanisms controlling dormancy in the arid zone grass *Aristida contorta*. II: Anatomy of the hull. *Aust. J. Bot.* 22, 647 (1974)
- NIEMANN, E., Vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung keimungshemmender Stoffe aus Früchten und Samen unter besonderer Berücksichtigung von *Foeniculum vulgare* MILLER. *Flora* 139, 185 (1952)
- NIETHAMMER, A., Lichtkeimungsprobleme im Zusammenhang mit physiol.- anatomischen Studien. *Beitr. Bot. Zbl., Abt. I* 47 (1931)
- OWEN, E.B., The storage of seeds for maintenance of viability. *Pastures Bulletin* 43, Commonwealth Agricultural Bureaux (1956)
- POLLOCK, B.M. und TOOLE, V.K., After- ripening, rest period and dormancy. *Seeds, Yb. Agric. U.S. Dep. Agric.* 106 (1961)
- SHAPMA, M.P., McBEATH, D.K., and VANDEN BORN, W.H., Studies on the biology of wild oats. I. Dormancy, germination and emergence. *Canadian J. Plant Sci.* 56, 611 (1976)
- SIDHU, S.S. und CAVERS, P.E., Maturity- dormancy relationships in attached and detached seeds of *Medicago lupulina* L. (Black medick). *Botanical Gazette* 130, (2), 174 (1977)

- STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriums-
handbuch. Springer Verlag B.H.N.Y. 1962, 2. Auflage
- STAJKOW, 1960. Untersuchungen über die Keimruhe des Samen in
Abhängigkeit von ihrem Reifegrad! Wiss. Arb. höherer
Landwirtsch. Inst. Wassil Kolaew- Flowdiw 6 1957/58.
herausg. 1959. Zit. nach Landwirtsch. Zbl., Abt. II
- STOKES, P. A physiological study of embryo development in
Heracleum sphondylium L. Annals of Botany 16, 442 (1952)
- STOKES, P., Temperature and seed dormancy. Encycl. Pl. Physiol.
15 (2), 746 (1965)
- VEGIS, A., Dormancy in higher plants. Annual Review of plant
physiology 15, 185 (1964)
- VILLIERS, T.A., and WAREING, P.F., Dormancy in fruits of
Fraxinus excelsior L. J. exp. Botany 15, 359 (1964)
- WEBB, D.P., VAN STADEN, J., and WAREING, P.F., Seed dormancy
in *Acer*. J. exp. Botany 24, No. 78, 105 (1973)
- WINTER, A.G., und SCHÖNBECK, F., Untersuchungen über die Be-
einflussung der Keimung und Entwicklung von Getreidesamen
durch Kaltwasserauszüge aus Getreidestroh. Die Naturwis-
senschaften 40, 168 (1953)
- WINTER, A.G., und SIEVERS, E., Untersuchungen über die Beein-
flussung der Samenkeimung durch Kaltwasserextrakte aus der
Blattstreu verschiedener Gramineen. Die Naturwissenschaf-
ten 39, 191 (1952)
- YOSHIMURA, O., and MURAYAMA, T., Effects of copper on the ger-
mination and the early growth stage of plants. Mem. Ehime.,
Univ., Ser. B (Biol.). Vol. 8, No. 1 (1976)
- ZADE, A., Der Flughafer. Inaug. Diss. Jena. pp. 1- 48. 1909

6. Tabellenanhang

=====

Zusammenstellung der in den Tabellen verwendeten Symbole:

L_K = Mittelwert der Koleoptillängen aus 3 Bestimmungen mit je 3 Petrischalen a 25 Haferkaryopsen

L_W = Mittelwert der Längen der Primärwurzeln aus 3 Bestimmungen mit je 3 Petrischalen a 25 Haferkaryopsen

W_K = Wachstum der Koleoptilen in %, bezogen auf den Wasserwert (= 100 %)

W_W = Wachstum der Primärwurzeln in %, bezogen auf den Wasserwert (= 100 %)

H_K = Hemmung des Wachstums der Koleoptilen = 100 % - W_K

H_W = Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln = 100 % - W_W

$1/H_W$ = Reziprokwert der Hemmung des Wachstums der Primärwurzeln

C = Konzentration der jeweiligen Lösung, bezogen auf das Volumen des Haferspelzenextraktes

$1/C$ = Reziprokwert der Konzentration der jeweiligen Lösung, bezogen auf das Volumen des Haferspelzenextraktes

C	L_K (mm)	W_K (%)	H_K (%)	L_W (mm)	W_W (%)	H_W (%)	$1/H_W$	$1/C$
H ₂ O	13,05	100,0	0,0	28,20	100,0	0,0		
Extrakt	8,77	67,2	32,8	11,90	42,2	57,8	0,0173	1,00
0,75	9,65	74,0	26,0	12,72	45,1	54,9	0,0182	1,33
0,50	10,55	80,8	19,2	19,77	70,1	29,9	0,0335	2,00
0,25	11,78	90,3	9,7	23,98	85,0	15,0	0,0667	4,00
0,10	12,55	96,2	3,8	29,91	106,1	- 6,1	-0,1639	10,00

Tab. VII: Darstellung der Werte für den Haferspelzenextrakt

C	L _K (mm)	W _K (%)	H _K (%)	L _W (mm)	W _W (%)	H _W (%)	1/H _W	1/C
H ₂ O	12,0	100,0	0,0	28,3	100,0	0,0		
10,00	0,2	1,7	98,3	0,1	0,4	99,6	0,0100	0,10
7,50	0,8	6,7	93,3	0,5	1,7	98,3	0,0102	0,13
5,00	2,2	18,3	81,7	2,7	9,5	90,5	0,0111	0,20
2,50	6,0	50,0	50,0	9,6	34,0	66,0	0,0152	0,40
1,00	8,7	72,5	27,5	16,0	56,5	43,5	0,0230	1,00
0,75	9,2	76,7	23,3	18,1	64,0	36,0	0,0278	1,33
0,50	10,1	84,2	15,8	23,5	83,0	17,0	0,0588	2,00
0,25	10,9	90,9	9,1	25,5	90,1	9,9	0,1010	4,00
0,10	11,6	96,7	3,3	28,9	102,1	-2,1	-0,4762	10,00

Tab. VIII: Darstellung der Werte für den Spelzenextrakt nach Gefriertrocknung

C	L _K (mm)	W _K (%)	H _K (%)	L _W (mm)	W _W (%)	H _W (%)	1/H _W	1/C
H ₂ O	12,2	100,0	0,0	28,2	100,0	0,0		
10,00	8,4	68,9	31,1	19,8	70,3	28,7	0,0348	0,10
7,50	8,6	70,5	29,5	21,4	75,9	24,1	0,0415	0,13
5,00	9,3	76,2	23,8	23,3	82,6	17,4	0,0575	0,20
2,50	10,5	86,1	13,9	26,6	94,3	5,7	0,1754	0,40
1,00	11,0	90,2	9,8	27,6	97,8	2,2	0,4545	1,00
0,75	11,1	91,0	9,0	28,6	101,4	-1,4	-0,7143	1,33
0,50	11,7	95,9	4,9	28,7	101,8	-1,8	-0,5555	2,00
0,25	11,4	93,4	6,6	26,6	94,3	5,7	0,1754	4,00
0,10	11,8	96,7	3,3	29,4	104,2	-4,2	-0,2381	10,00

Tab. IX: Darstellung der Werte für Fraktion I der Gelfiltration des Haferspelzenextraktes an Acrylex- P 2

C	L _K (mm)	W _K (%)	H _K (%)	L _W (mm)	W _W (%)	H _W (%)	1/H _W	1/C
H ₂ O	12,2	100,0	0,0	28,2	100,0	0,0		
10,00	1,2	9,8	90,2	1,0	3,5	96,5	0,0104	0,10
7,50	2,1	17,2	82,8	2,1	7,4	92,6	0,0108	0,13
5,00	4,3	35,2	64,8	5,1	18,1	81,9	0,0122	0,20
2,50	7,4	60,7	39,3	9,3	33,0	67,0	0,0149	0,40
1,00	8,9	73,0	27,0	15,1	53,5	46,5	0,0215	1,00
0,75	9,9	81,1	18,9	18,4	65,2	34,8	0,0287	1,33
0,50	10,4	85,2	14,8	22,5	79,8	20,2	0,0495	2,00
0,25	10,9	89,3	10,7	26,7	94,7	5,3	0,1887	4,00
0,10	11,0	90,2	9,8	27,9	98,9	1,1	0,9091	10,00

Tab. X: Darstellung der Werte der Fraktion II der Gelfiltration des Haferspelzenextraktes an Acrylex- P 2

C	L _K (mm)	W _K (%)	H _K (%)	L _W (mm)	W _W (%)	H _W (%)	1/H _W	1/C
H ₂ O	12,2	100,0	0,0	28,2	100,0	0,0		
10,00	10,4	85,6	14,4	27,6	97,7	2,3	0,4348	0,10
7,50	10,5	86,1	13,9	29,0	103,0	-3,0	-0,3333	0,13
5,00	10,7	87,4	12,6	29,9	106,1	-6,1	-0,1639	0,20
2,50	11,6	94,8	5,2	30,7	109,0	-9,0	-0,1111	0,40
1,00	11,5	94,6	5,4	29,6	104,9	-4,9	-0,2041	1,00
0,75	11,2	91,8	8,2	30,4	107,8	-7,8	-0,1282	1,33
0,50	11,3	93,0	7,0	30,6	108,6	-8,6	-0,1163	2,00
0,25	11,8	96,4	3,6	30,5	108,2	-8,2	-0,1220	4,00
0,10	11,3	92,4	7,6	29,9	106,1	-6,1	-0,1639	10,00

Tab. XI: Darstellung der Werte der Fraktion III der Gelfiltration des Haferspelzenextraktes an Acrylex- P 2

C	L _K (mm)	W _K (%)	H _K (%)	L _W (mm)	W _W (%)	H _W (%)	1/H _W	1/C
H ₂ O	11,3	100,0	0,0	27,9	100,0	0,0		
10,00	7,5	66,4	33,6	13,2	47,3	52,7	0,0190	0,10
7,50	8,4	74,3	25,7	15,7	56,3	43,7	0,0229	0,13
5,00	9,5	84,1	15,9	17,6	63,1	36,9	0,0271	0,20
2,50	10,6	93,8	6,2	21,2	76,0	24,0	0,0417	0,40
1,00	11,4	100,9	-0,9	24,1	86,4	13,6	0,0735	1,00
0,75	11,4	100,9	-0,9	26,3	94,3	5,7	0,1754	1,33
0,50	11,7	103,5	-3,5	28,1	100,7	-0,7	1,4286	2,00
0,25	11,7	103,5	-3,5	27,3	97,8	2,2	0,4545	4,00
0,10	11,6	102,7	-2,7	27,9	100,0	0,0	∞	10,00

Tab. XII: Darstellung der Werte der Ätherphase pH 7,0

C	L _K (mm)	W _K (%)	H _K (%)	L _W (mm)	W _W (%)	H _W (%)	1/H _W	1/C
H ₂ O	11,3	100,0	0,0	27,9	100,0	0,0		
10,00	3,2	28,3	71,7	1,8	6,4	93,6	0,0107	0,10
7,50	4,3	38,1	61,9	3,4	12,2	87,8	0,0114	0,13
5,00	6,2	54,9	45,1	7,7	27,6	72,4	0,0138	0,20
2,50	9,3	82,3	17,7	15,4	55,2	44,8	0,0223	0,40
1,00	10,4	92,0	8,0	21,1	75,6	24,4	0,0410	1,00
0,75	10,8	95,6	4,4	23,0	82,4	17,6	0,0568	1,33
0,50	11,5	101,8	-1,8	25,1	90,0	10,0	0,1000	2,00
0,25	11,4	100,9	-0,9	26,6	95,3	4,7	0,2128	4,00
0,10	11,7	103,5	-3,5	28,6	102,5	-2,5	-0,4000	10,00

Tab. XIII: Darstellung der Werte der Ätherphase pH 1,0

C	L_K (mm)	W_K (%)	H_K (%)	L_W (mm)	W_W (%)	H_W (%)	$1/H_W$	$1/C$
H ₂ O	11,3	100,0	0,0	27,9	100,0	0,0		
10,00	2,3	20,4	79,6	2,8	10,0	90,0	0,0111	0,10
7,50	4,4	39,9	60,1	7,3	26,2	73,8	0,0136	0,13
5,00	6,6	58,4	41,6	9,8	35,1	64,9	0,0154	0,20
2,50	8,4	74,4	25,6	14,3	51,3	48,7	0,0205	0,40
1,00	10,4	92,0	8,0	22,3	79,9	20,1	0,0498	1,00
0,75	10,7	94,7	5,3	24,4	87,7	12,5	0,0800	1,33
0,50	10,4	92,0	8,0	25,0	89,6	10,6	0,0960	2,00
0,25	11,2	99,1	0,9	28,4	101,8	-1,8	-0,5555	4,00
0,10	11,7	103,5	-3,5	29,2	104,6	-4,6	-0,2174	10,00

Tab. XIV: Darstellung der Werte der nach dem Ausschütteln der Fraktion II der Gelfiltration mit Äther bei verschiedenen pH- Werten verbleibenden wässrigen Phase

Lebenslauf

- 20.1.1945: Geburt in St. Gilgen (Landkr. Starnberg)
- Sept. 1951: Einschulung in die Volksschule Gröbenzell
- Sept. 1956: Übertritt in das mathematisch- naturwis-
senschaftliche Max- Planck- Gymnasium in
München- Pasing
- 1.10.67- 31.3.69 Ableistung des Grundwehrdienstes
- April 1969: Beginn des Studiums der Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
- Mai 1971: Diplom- Vorprüfung
- Okt. 1974: Diplom- Hauptprüfung in Biologie an der
Universität München
- Okt. 1974: Beginn der Dissertation am Botanischen
Institut der Universität München (Lehr-
stuhl Phytochemie) unter Leitung von
Prof. Dr. W. Rüdiger

